

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

PROF. DR. H. J. SCHLITT

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing senescence and proliferation arrest in cancer cells**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

CAROLINE THERESA SEEBAUER

2017





AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

PROF. DR. H. J. SCHLITT

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural  
and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing  
senescence and proliferation arrest in cancer cells**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

CAROLINE THERESA SEEBAUER

2017

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans J. Schlitt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Evert

Tag der mündlichen Prüfung:

13.07.2017

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
------------------------------	------------

<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
----------------------------	----------

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
------------------------------	-----------

<b>ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATION</b>	<b>8</b>
--	----------

<b>1.1 Einleitung</b>	<b>8</b>
-----------------------	----------

<b>1.2 Methoden</b>	<b>12</b>
---------------------	-----------

1.2.1 Patienten	12
-----------------	----

1.2.2 Immunhistochemische Färbungen	12
-------------------------------------	----

1.2.3 RNA-Isolation und PCR Array	14
-----------------------------------	----

1.2.4 Zellisolierung	14
----------------------	----

1.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)	15
-----------------------------------	----

1.2.6 Statistische Auswertung	16
-------------------------------	----

<b>1.3 Ergebnisse</b>	<b>17</b>
-----------------------	-----------

1.3.1 Tumorzellen der Peritonealkarzinose befinden sich in Seneszenz und zeigen geringe Proliferationsraten	17
---	----

1.3.2 Die peritoneale Metastasierung des primären kolorektalen Karzinoms wird von einer Änderung der Immunzellinfiltration im Tumormilieu begleitet	19
---	----

1.3.3 Nach erfolgter peritonealer Metastasierung ermöglichen erhöhte IFN- $\gamma$ - und TNF-Level im Tumormilieu der Peritonealkarzinose „Immunosurveillance“	24
--	----

1.3.4 Das Tumormilieu der Peritonealkarzinose fördert ausgeprägte Gefäßneubildung	27
---	----

1.3.5 Tumorzellteilungsraten der Peritonealkarzinose sind von der Balance zwischen IFN- $\gamma$ und IL-17 beeinflusst	29
--	----

1.4	Diskussion	31
1.5	Zusammenfassung	37

<b><u>PERITONEAL CARCINOMATOSIS OF COLORECTAL CANCER IS</u></b>		
<b><u>CHARACTERIZED BY STRUCTURAL AND FUNCTIONAL REORGANIZATION OF</u></b>		
<b><u>THE TUMOR MICROENVIRONMENT INDUCING SENESENCE AND</u></b>		
<b><u>PROLIFERATION ARREST IN CANCER CELLS</u></b>		<b>39</b>
2.1	Published article	40
2.2	Supporting Figures	52
<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>		<b>55</b>
<b><u>DANKSAGUNG</u></b>		<b>63</b>
<b><u>LEBENS LAUF</u></b>		<b>64</b>
<b><u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u></b>		<b>66</b>

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Pathogenese der peritonealen Metastasierung nach Ceelen et al.<sup>4</sup></i>	9
<i>Abb. 2: Zielgerichtete Krebstherapie anhand von „Hallmarks of Cancer“ nach Hanahan und Weinberg</i>	10
<i>Abb. 3: Immunhistochemische Auswertung der Proliferationsraten anhand der Proliferationsmarker Ki-67, PCNA und Cyclin D1</i>	18
<i>Abb. 4: Immunhistochemische Auswertung der Seneszenzraten anhand der Seneszenzmarker H3K9me3, p21<sup>Cip1</sup> und CDKN2A</i>	18
<i>Abb. 5: FACS Analysen von CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Tumorumgebung der Peritonealkarzinose und des primären kolorektalen Karzinoms</i>	20
<i>Abb. 6: Immunhistochemische Auswertungen der Immunzellmarker CXCR5, CD20, CD79a, CD138, CD4, CD8 und PRG2</i>	21
<i>Abb. 7: Ergebnisse für IL-15, CD8 und CCL11 ermittelt durch PCR Arrays der T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Immunantwort in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	22
<i>Abb. 8: Immunhistochemische Auswertungen der NK-Zell-Färbung anhand des NK-Zellmarkers CD57 in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	23
<i>Abb. 9: FACS Analysen des zytotoxischen Potentials von tumorinfiltrierenden NK-Zellen</i>	24
<i>Abb. 10: Immunhistochemische Auswertungen des Effektorzytokins IL-17 und des Transkriptionsfaktors Foxp3 in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	25

<i>Abb. 11: FACS Analysen von CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tumor infiltrierenden Lymphozyten</i>	25
<i>Abb. 12: Immunhistochemische Auswertungen des Effektorzytokins IFN-<math>\gamma</math> in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	26
<i>Abb. 13: Ergebnisse für IFN-<math>\gamma</math>, TNF, IL-17 und IL-17-R in PCR Arrays der T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Immunantwort in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	27
<i>Abb. 14: Ergebnisse der für Angiogenese-relevanten Genen in PCR Arrays der T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Immunantwort in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	28
<i>Abb. 15: Immunhistochemische Auswertung der Neovaskularisation in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms</i>	29
<i>Abb. 16: Überblick über die Immunantwort im Tumormikromileu der Peritonealkarzinose und des primären kolorektalen Karzinoms</i>	36

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tab. 1: Primärantikörper der Immunhistochemie (anti-human)</i>	13
<i>Tab. 2: FACS Antikörper (anti-human, monoklonal)</i>	15
<i>Tab. 3: Statistische Auswertung der Proliferations- und Seneszenzraten</i>	19
<i>Tab. 4: Statistische Auswertung der Immunzell-Marker</i>	20
<i>Tab. 5: Statistische Auswertung der Effektorzytokine und Transkriptionsfaktoren</i>	26
<i>Tab. 6: Statistische Auswertung der Angiogenese</i>	29



## Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
ACTB	β-Aktin
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
CCL11	Chemokine Ligand 11
CD	Differenzierungs-Cluster (Cluster of Differentiation)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (Cyclin Dependent Kinase)
CDKN2A	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
CI	Konfidenzintervall (Confidence Interval)
CRS	Zytoreduktive Resektion (Cytoreductive Surgery)
CXCR5	CXC-Chemokinrezeptor 5
DAB	3,3'-Diaminobenzidinetetrahydrochlorhydrat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
H3K9me3	Tri-Methyl-Histone H3
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
HPF	High Power Field
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
ILC	Spezielle Immunzellen an Epitheloberflächen (Innate Lymphoid Cells)
Ki-67	Kiel 67
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Onkogen
mRNA	messenger RNA
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)

NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PC	Peritonealkarzinose (Peritoneal Carcinomatosis)
pCRC	primäres Kolorektales Karzinom (primary Colorectal Cancer)
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pKRK	primäres Kolorektales Karzinom
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRG2	Proteoglykan 2
p21 <sup>Cip1</sup>	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RPMI	Entwicklungsort des Kulturmediums (Roswell Park Memorial Institute)
RUNX1	Runt-related Transcription Factor 1
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
STAT	Transkriptionsfaktor (Signal Transducers and Activators of Transcription)
T <sub>C</sub> -Zellen	Zytotoxische T-Zellen
T <sub>FH</sub> -Zellen	Follikuläre T-Helferzellen
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub> -Zellen	Regulatorische T-Zellen
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer)
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor-A

## **Zusammenfassung der Publikation**

### **1.1 Einleitung**

Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. gibt die Inzidenz des primären kolorektalen Karzinoms im Jahr 2012 mit etwa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland an. Zum Zeitpunkt der Diagnose des primären kolorektalen Karzinoms ist bei etwa 10% der Patienten bereits Peritonealkarzinose festzustellen<sup>1</sup>. Somit ergeben sich etwa 7.000 Patienten pro Jahr mit synchroner peritonealer Metastasierung.

Im Gegensatz zur hämatogenen und lymphogenen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms, entwickelt sich Peritonealkarzinose durch Tumorzellausbreitung per continuitatem ausgehend vom Primärtumor oder durch Tumorzellverschleppung im Rahmen der Primärtumorresektion<sup>2</sup>. Sobald die Tumorzellen Anschluss an die Peritonealhöhle gefunden haben, verteilen sie sich mit der zirkulierenden peritonealen Flüssigkeit, heften sich durch Zell-Zell-Kontakte an das Mesothel des Peritoneums an und durchwandern dies, um in der Lamina propria vaskularisiert zu werden (Abb. 1)<sup>3</sup>. Besonders postoperative Entzündungsreaktionen und immunologische Prozesse, die an Wundheilungsvorgängen beteiligt sind, scheinen die Implantation und Proliferation der Tumorzellen zu fördern<sup>4</sup>.

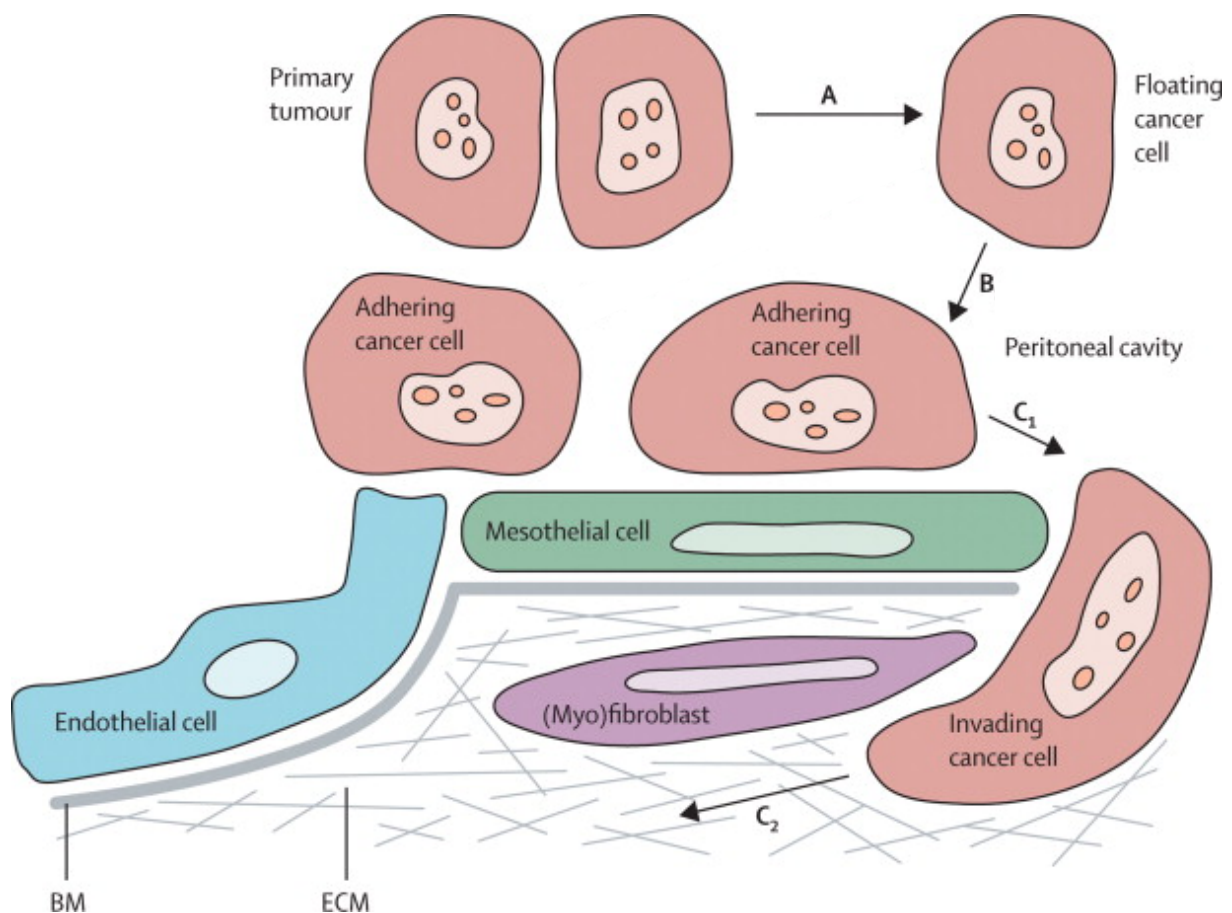


Abb. 1: Pathogenese der peritonealen Metastasierung nach Ceelen et al.<sup>4</sup>

A) Zellablösung, B) Zelladhäsion, C1) Apoptoseinduktion und Invasion, C2) Degradation und Infiltration; BM Basalmembran, ECM extrazelluläre Matrix.

Sugraker et al. und Spratt et al. beschrieben erstmals das Prinzip der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC), sowie die Peritonektomie als Therapiekonzept für Peritonealkarzinose<sup>5-7</sup>. Heutzutage bietet, im Gegensatz zur palliativen systemischen Chemotherapie<sup>8</sup>, die komplette zytoreduktive Resektion (CRS) gefolgt von HIPEC eine Therapie mit kurativem Ansatz. Trotzdem liegt die mediane 5-Jahres-Überlebensrate der Peritonealkarzinose-Patienten bei nur etwa 30%<sup>9-16</sup>. Es existiert kein molekularbiologischer oder immunologischer Marker um ein Ansprechen auf diese aggressive Therapieform vorherzusagen.

Um Angriffspunkte für eine zielgerichtete Krebstherapie aufzuzeigen, beschrieben Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 zum ersten Mal sechs „Hallmarks of Cancer“. Diese bestehen aus der Fähigkeit der Krebszellen dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu entkommen, die Eigenversorgung durch wachstumsstimulierenden Signale (Proliferation) zu garantieren und wachstumshemmende Signalwege zu blockieren. Zusätzlich ist es für maligne Zellen von Bedeutung, das Wandern in

zellfremdes Gewebe zu ermöglichen (Invasion und Metastasierung), über den Blutkreislauf ausreichend Nährstoffe zu erlangen (Angiogenese) und über ein unbegrenztes replikatives Potential zu verfügen. Diese „Hallmarks of Cancer“ wurden 2011 um weitere Eigenschaften erweitert (Abb. 2). Dazu gehören das Vermeiden von Tumorzell-Zerstörung durch Immunzellen sowie die Erkenntnis, dass sich maligne Tumore Mikroumgebungen schaffen, die Einfluss auf die Karzinogenese nehmen<sup>17</sup>. Dabei ist die im Tumormilieu stattfindende Entzündungsreaktion mit Tumorprogression verknüpft<sup>18</sup>.

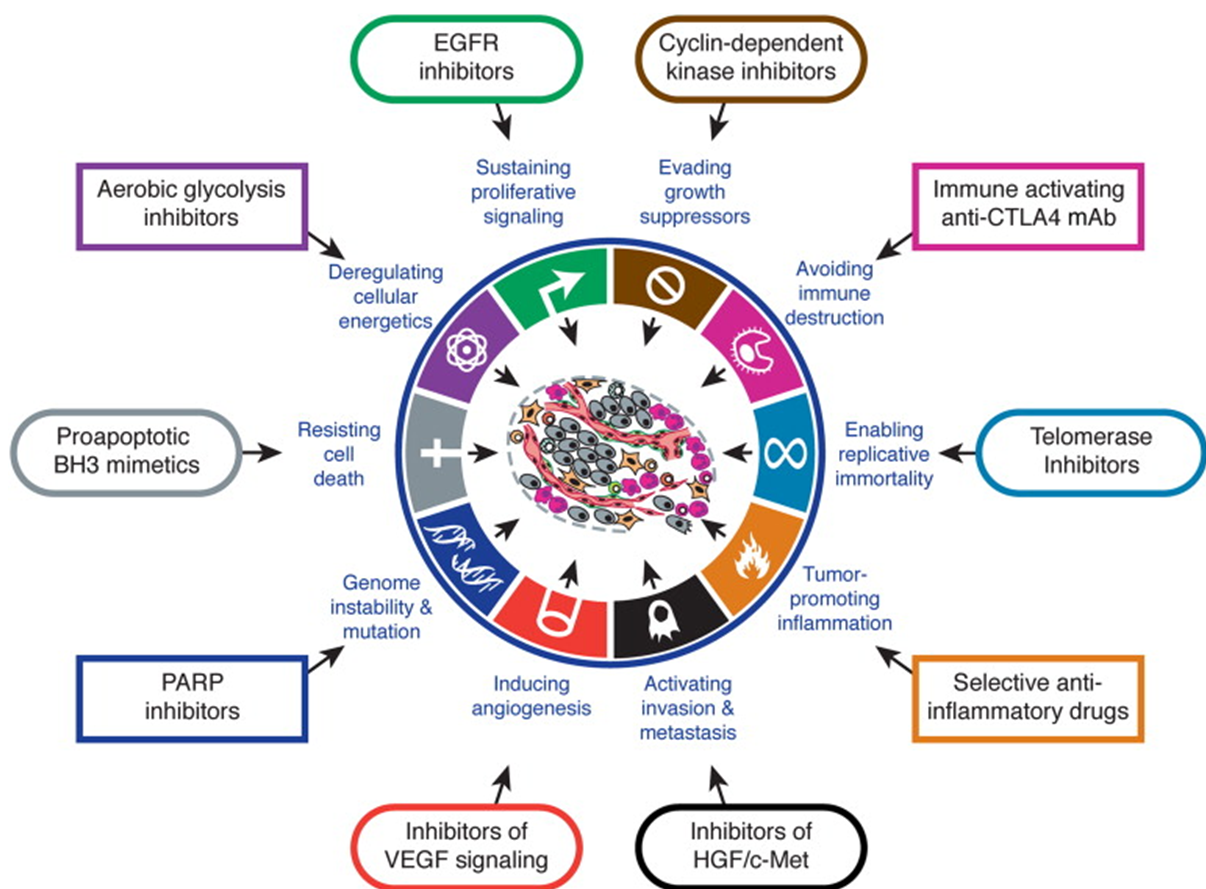


Abb. 2: Zielgerichtete Krebstherapie anhand von „Hallmarks of Cancer“ nach Hanahan und Weinberg

Bei der Entstehung des primären kolorektalen Karzinom sind Immunzellen und Immunmediatoren im Tumormilieu von Bedeutung. Proinflammatorische Zytokine führen zu Mutationen in Onkogenen (KRAS) und Tumorsuppressorgenen (APC, p53)<sup>19,20</sup>. B-Zellen und verschiedenen T-Zell-Subtypen zeigen proinflammatorische und Tumor-fördernden Eigenschaften. Insbesondere unterstützen die Zytokine von T<sub>reg</sub>- und T<sub>H17</sub>-Zellen (T<sub>reg</sub>: IL-10, TGF- $\beta$ ; T<sub>H17</sub>: IL-17, IL-21, IL-22) das Überleben der Tumorzellen und fördern Tumorwachstum. Im Rahmen der angeborenen

Immunantwort führen Makrophagen, Dendritische Zellen und Neutrophile Granulozyten durch die Produktion von IL-1, IL-6, IL-23, TNF und VEGF zu Tumorwachstum und vermitteln Neovaskularisation<sup>21</sup>.

Demgegenüber steht die immunologisch gesteuerte Tumorbekämpfung, die das Wachstum von Malignomen reguliert, genannt „Tumor-Immunosurveillance“. Im Tumormilieu des primären kolorektalen Karzinoms führen  $CD8^+$   $T_C$ -Zellen,  $CD4^+$   $T_{H1}$ -Zellen und NK-Zellen mit ihren Tumor-hemmenden Eigenschaften durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , Perforinen und Granzyme „Immunosurveillance“ aus<sup>22</sup>. Daraus leitet sich ab, dass eine  $T_{H1}$ - und  $T_C$ -Lymphozyteninfiltration des primären kolorektalen Tumormilieus positiven Einfluss auf den klinischen Outcome hat, insbesondere in Bezug auf Tumorausdehnung, krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben. Hingegen ist eine niedrige T-Zell Dichte, vor allem an T-Gedächtniszellen (ehemalige  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen), sowie eine vermehrte  $T_{H17}$ -Lymphozyteninfiltration der Tumorumgebung mit einer schlechten Prognose des primären kolorektalen Karzinoms verbunden<sup>23–28</sup>.

Der Einfluss der Immunzellen auf die Karzinogenese, die Tumorausdehnung und die Prognose des primären kolorektalen Karzinoms ist bekannt. Im Hinblick auf Peritonealkarzinose gibt es hierzu bisher keine Daten.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Tumormilieu von Peritonealkarzinose im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom zu beschreiben und aufzuzeigen welchen Einfluss die umgebenden Immunzellen auf Tumorzellproliferation, -seneszenz und Neovaskularisation haben.

## **1.2 Methoden**

### **1.2.1 Patienten**

Es wurden Formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete Peritonealkarzinose-Proben (n = 38), die von 2004 bis 2008 operativ reseziert wurden, analysiert. In die Kontrollgruppe wurden Patienten mit primären kolorektalem Karzinom (n = 45) ohne weitere Metastasierung eingeschlossen, deren Karzinom zwischen 2004 und 2011 operativ entfernt wurde. Es wurden nur Patienten mit Primärtumorlokalisation des Appendix, des Colons oder des Rektums zugelassen. Die Proben wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. Dabei wurden Proben von 21 Männern und 16 Frauen untersucht. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 52 Jahren (Spannweite 26–78 Jahre). Zur Erfassung der Tumorlast wurde der Peritonealkarzinose-Index (PCI) verwendet. Bei einem möglichen Wert von 0-39, lag der PCI im Mittel bei 16. Für die FACS-Analysen wurden Proben von acht Patienten mit der Diagnose Peritonealkarzinose kolorektalen Ursprungs verwendet, die 2014 operativ therapiert wurden. Die Resektionen wurden von erfahrenen Chirurgen durchgeführt und das Forschungsmaterial im Rahmen von routinemäßigen pathologischen Untersuchungen entnommen. Die Daten bezüglich pathologischer Diagnose, PCI, TNM Stadium und Überleben stammen aus der Datenbank der Klinik für Chirurgie sowie dem Tumorzentrum Regensburg e.V. Diese Arbeit wurde an der Klinik für Chirurgie am Universitätsklinikum Regensburg unter der Ethikantragsnummer 14-101-0014 mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten gemäß der Deklaration von Helsinki zu ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen durchgeführt.

### **1.2.2 Immunhistochemische Färbungen**

Aus FFPE-Gewebe wurden mit einem Rotationsmikrotom 3 bis 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und nach Anleitung der Hersteller immunhistochemische Gewebefärbungen durchgeführt. Dabei wurden das ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum Kit (HRP060; Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) und das ZytoChemPlus (HRP) Anti-Rabbit Kit (HRP060-RB; Zytomed Systems) verwendet, welche Blockierungslösung, biotinylierte Sekundärantikörper und Streptavidin-HRP-Konjugate enthalten. Die Primärantikörper (Tab. 1) wurden mit Antikörperverdünnungslösung (ALI20RI00; DCS, Hamburg, Deutschland) verdünnt.

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller	
CXCR5	Hase	polyklonal	1:1500	Sigma-Aldrich	HPA042432
IFN-γ	Hase	polyklonal	1:500	Abcam	ab25101
PRG2	Hase	polyklonal	1:500	Sigma-Aldrich	HPA038515
Ki-67	Hase	monoklonal	1:100	Abcam	ab16667
H3K9me3	Hase	monoklonal	1:500	Cell Signaling	#9733S
PCNA	Hase	monoklonal	1:5000	Cell Signaling	#13110
p21 <sup>Cip1</sup>	Hase	monoklonal	1:200	Cell Signaling	#2947
Cyclin D1	Hase	monoklonal	1:100	Cell Signaling	#2978
CDKN2A	Maus	monoklonal	1:800	Abcam	ab54210
CD34	Maus	monoklonal	1:20	Ventana	790-2927
Foxp3	Ratte	monoklonal	1:250	eBioscience	14-4776
IL-17	Ziege	polyklonal	1:50	R&D Systems	AF-317-NA

Tab. 1: Primärantikörper der Immunhistochemie (anti-human)

Farbsignale wurden mittels DAB Kit (Merck, Darmstadt, Deutschland) oder AEC+High Sensitivity Substrate Chromogen Kit (Dako, Hamburg, Deutschland) sichtbar gemacht. CD4-, CD8-, CD57-, CD20-, CD79a- und CD138-Färbungen wurden durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt.

Die Färbungen wurden mittels Axio Observer Z1 Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) dokumentiert. Um positive Färbungen zu quantifizieren, wurden pro Gewebeprobe fünf Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung (high power field, HPF) durch zwei unabhängige Untersucher mittels ImageJ (National Institutes of Health, USA) ausgezählt.

Zur Berechnung der Proliferationsraten wurden die Proliferationsmarker Ki-67, PCNA und Cyclin D1 verwendet und mittels folgender Gleichung bestimmt:  $PR =$

$$\frac{\text{Anzahl der proliferierenden Zellen}}{\text{Anzahl der proliferierenden Zellen} + \text{Anzahl der nicht-proliferierenden Zellen}}$$
. Die Seneszenzraten wurden anhand der Seneszenzmarker H3K9me3, p21<sup>Cip1</sup> und CDKN2A mittels der



Gleichung  $SR = \frac{\text{Anzahl der seneszenten Zellen}}{\text{Anzahl der seneszenten Zellen} + \text{Anzahl der nicht-seneszenten Zellen}}$  bestimmt.

Zur Berechnung der Neovaskularisation wurde die Oberfläche der Gefäße mittels CD34-Antikörper angefärbt und mittels ImageJ vermessen. Das Programm errechnet die Oberfläche in „Square Inch“ (Quadratzoll). Ein Square Inch entspricht 6,4516 cm<sup>2</sup>.

### 1.2.3 RNA-Isolation und PCR Array

Nach Anleitung des Herstellers wurde mittels RNeasy FFPE Kit (73504; Qiagen, Hilden, Deutschland) RNA aus FFPE-Gewebeproben isoliert. Es wurden pro Probe 3 Schnitte mit einer Dicke von 10µm verwendet. Für die Analyse wurde zwei Gruppen gebildet. Dabei stellte ein Pool aus zehn Peritonealkarzinose-Gewebeproben die zu untersuchende Gruppe dar und ein Pool aus zehn Gewebeproben des primären kolorektalen Karzinoms diente als Vergleichsgruppe. Pro Gruppe wurde insgesamt 900ng RNA verwendet. Die reverse Transkription der RNA wurde mittels RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit (330451; Qiagen) mit RT2 PreAMP Pathway Primer Mix Human TH1 & TH2 Responses (330241 PBH-034Z; Qiagen) und RT2 PreAMP Pathway Primer Mix Human TH17 Response (330241 PBH-073Z; Qiagen) nach Herstelleranleitung durchgeführt. Dabei wurde die Expression von Genen, die für T<sub>H1</sub>-, T<sub>H2</sub>- und T<sub>H17</sub>-Immunantwort von Bedeutung sind, mittels RT2 Profiler PCR Array Human TH1 & TH2 Responses (330231 PAHS-034ZA; Qiagen) und RT2 Profiler PCR Array Human TH17 Response (330231 PAHS-073ZA; Qiagen) unter Verwendung von RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (330500; Qiagen) und einem LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

Die Auswertungen der PCR Array Ergebnisse werden als normalisierte ( $2^{-\Delta C_t}$ ) Genexpression in Peritonealkarzinose im Verhältnis zur normalisierten ( $2^{-\Delta C_t}$ ) Genexpression im primären kolorektalen Karzinoms angegeben. Eine Hochregulation ist in den Graphiken rot markiert, eine Herunterregulation grün. Als Housekeeping-Gen dient β-Aktin.

### 1.2.4 Zellisolierung

Peritonealkarzinose-Gewebeproben und Gewebeproben des primären kolorektalen Karzinoms wurden in HBSS Medium (14170-088, Gibco, Grand Island, NY, USA) manuell zerkleinert und durch ein 100µm und 40µm Nylon-Zellsieb (Schubert & Weiss, München, Deutschland) gesiebt. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurde bei 4°C und 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Um rote Blutkörperchen zu entfernen

wurde das Pellet mit ACK Lyse Puffer (Lonza Walkersville, Walkersville, MD, USA) behandelt und 90 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in RPMI Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™ (72400-021, Gibco) mit FCS (Sigma-Aldrich) und Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) gelöst und mit Cell Stimulation Cocktail (00-4975-93; eBioscience), der PMA, Ionomycin und Brefeldin A enthält, bei 37°C 3 Stunden stimuliert. Dadurch werden die Zellen zur Zytokinproduktion angeregt, während der Golgi-Apparat blockiert wird. Somit werden Zytokine angereichert ohne sezerniert zu werden.

### 1.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die in der Zellisolierung gewonnenen Zellen der Tumorgewebsarten wurden in FACS Puffer, bestehend aus PBS versetzt mit 3% FCS und Natriumazid (Sigma-Aldrich), gelöst und mit monoklonalen Antikörpern (Tab. 2) nach Herstellerangaben gefärbt. Für die intrazellulären Färbungen wurden die Zellen mittels Fixation/Permeabilization Diluent (00-5223-56; eBioscience) und Concentrate (00-5123-43; eBioscience) fixiert und permeabilisiert.

Antikörper	Konjugat	Hersteller	
CD45	Horizon V500	BD	560777
CD3	PacBlue	Miltenyi Biotec	130-094-363
CD4	PE Vio770	Miltenyi Biotec	130-094-153
CD4	PercP	Miltenyi Biotec	130-094-963
CD8	APC Vio 770	Miltenyi Biotec	130-096-561
CD56	APC	Beckman Coulter	IM2474
CD107a	PacBlue	Miltenyi Biotec	130-095-520
IFN-γ	FITC	eBioscience	11-7319-82
Foxp3	PECy7	eBioscience	25-1178-42
Perforin	PECy7	eBioscience	25-9994-42

Tab. 2: FACS Antikörper (anti-human, monoklonal)

Die FACS-Analysen wurden mit einem FACSCanto II Durchflusszytometer (BD Biosciences) durchgeführt. Die dazugehörigen Daten wurden durch die FACS Diva Software 6.0 ermittelt und mit der FlowJo Software (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA) ausgewertet.

### **1.2.6 Statistische Auswertung**

Vor der statistischen Auswertung wurde die Normalverteilung der Werte mittels Kolmogorov-Smirnow-Test ermittelt. Normalverteilte Daten wurden anhand des Student's t-Test, nicht normalverteilte Daten durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, ausgewertet. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet und mit einem Asteriskus (\*) gekennzeichnet. Werte mit  $P \leq 0,01$  wurden mit (\*\*),  $P \leq 0,001$  mit (\*\*\*) und  $P \leq 0,0001$  mit (\*\*\*\*) vermerkt. Nicht signifikante Werte,  $P > 0,05$ , wurden mit (n.s.) gekennzeichnet. Der Mittelwert und die Standardabweichung sind in den Graphiken dargestellt. Beziehungen zu Proliferation und Seneszenz der Tumorzellen wurden anhand der Pearson-Korrelation mit bivariatem Analyseverfahren ermittelt. Die Statistik wurden mittels SPSS Statistics Software (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) ausgewertet. Graph Pad Prism wurde zur Berechnung der Standardabweichung (SD), des Mittelwerts, des Medians und des 95% Konfidenzintervalls (CI) aller Daten verwendet. Alle histologischen Auswertungen wurden unabhängig und verblindet ausgewertet. Um Reproduzierbarkeit zu garantieren wurden nach einiger Zeit stichprobenartig einzelne Proben erneut ausgewertet. Dabei lag die Konkordanzrate über 95%.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 Tumorzellen der Peritonealkarzinose befinden sich in Seneszenz und zeigen geringe Proliferationsraten

Der Einfluss der Tumorumgebung auf die Karzinogenese des primären kolorektalen Karzinoms wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht<sup>29</sup>. Dennoch gibt es kaum Informationen zu dem Tumormilieu, welches Peritonealkarzinose umgibt, und dessen Auswirkungen auf die Tumorzellen. Um einen Einblick in das Proliferationsverhalten und den Zellzyklus der Tumorzellen der Peritonealkarzinose zu erhalten, wurden Proliferations- sowie Seneszenzraten der Peritonealkarzinose durch Immunhistochemie bestimmt und mit den Zellteilungsraten des primären kolorektalen Karzinoms verglichen. Zur Bestimmung der Proliferationsraten wurden die Proliferationsmarker Ki-67, Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Cyclin D1 verwendet. Als Marker für Zellen, die sich in Seneszenz befinden, wurden die Seneszenzmarker Tri-Methyl-Histone H3 (H3K9me3), Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1 (p21<sup>Cip1</sup>) und Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A / p16<sup>INK4A</sup>) gewählt.

Sich schnell und unkontrolliert teilende Tumorzellen sind oftmals ein Kennzeichen von aggressiven Malignomen<sup>30</sup>. Die Anfangsvermutung lautete deshalb, dass die verkürzte Lebenserwartung der Patienten mit der Diagnose Peritonealkarzinose<sup>31</sup> auf eine hohe Proliferationsrate der Tumorzellen zurückzuführen ist. Überraschender Weise war das Gegenteil der Fall: Tumorzellen der Peritonealkarzinose zeigten signifikant niedrigere Proliferationsraten als Tumorzellen des primären kolorektalen Karzinoms. Zusätzlich befanden sich bei Peritonealkarzinose signifikant mehr Tumorzellen in Seneszenz verglichen mit dem primären kolorektalen Karzinom (Abb. 3 und 4, Tab. 3). Zusätzlich besteht eine positive Korrelation zwischen den beiden Proliferationsmarkern Ki-67 und Cyclin D1 (P = 0.034; n = 34), was die Konkordanz der gefundenen Ergebnisse unterstreicht.

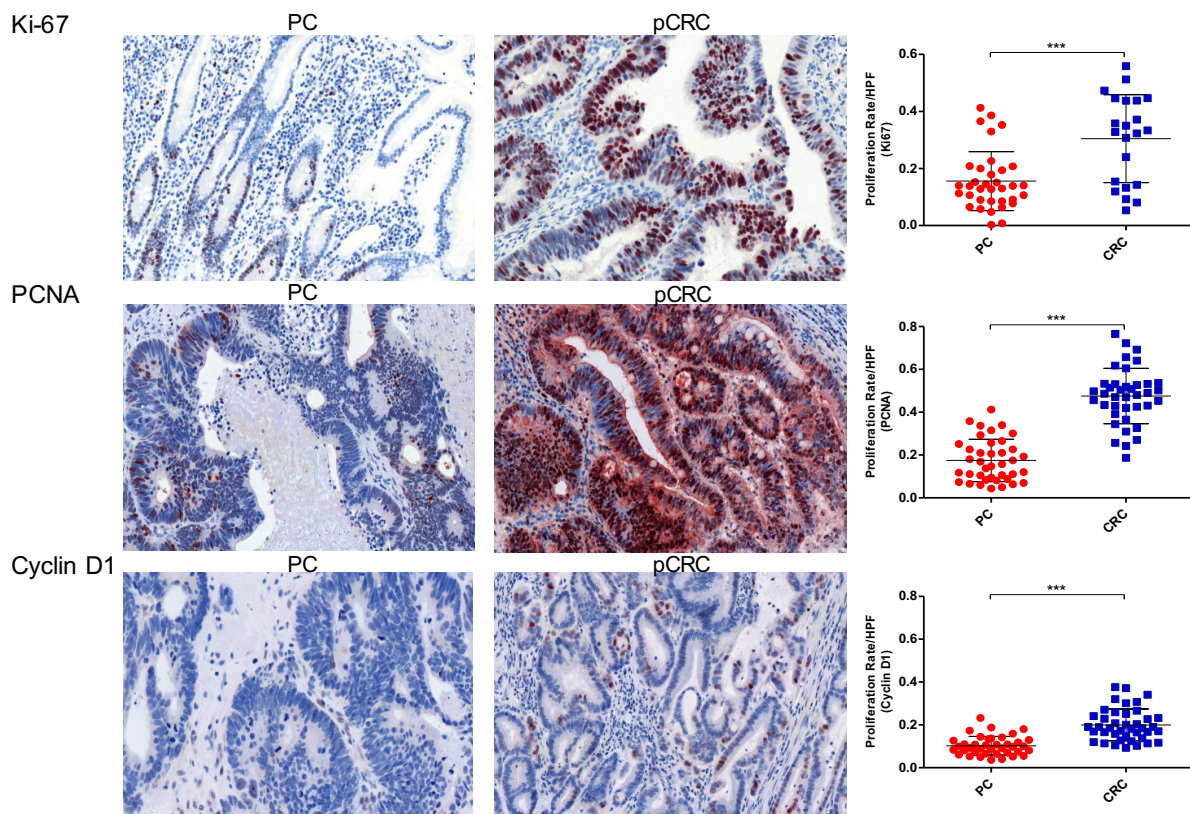


Abb. 3: Immunhistochemische Auswertung der Proliferationsraten anhand der Proliferationsmarker Ki-67, PCNA und Cyclin D1

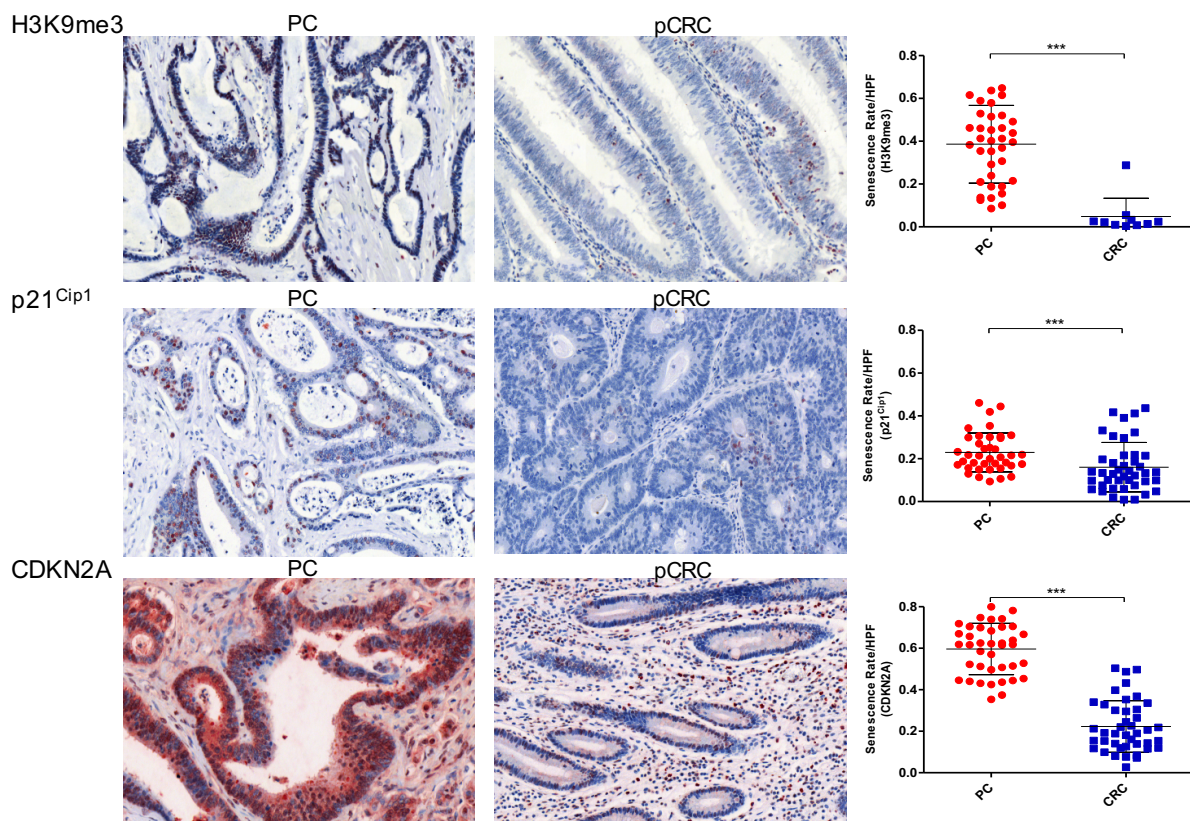


Abb. 4: Immunhistochemische Auswertung der Seneszenzraten anhand der Seneszenzmarker H3K9me3, p21<sup>Cip1</sup> und CDKN2A

Zellteilungsrate	PC (Rate/HPF)			KRK (Rate/HPF)			P
	MW±SD	95% CI	n	MW±SD	95% CI	n	
Proliferation							
Ki-67	0.16±0.10	0.12-0.19	35	0.30±0.15	0.24-0.37	23	0.0006
PCNA	0.17±0.10	0.14-0.21	39	0.48±0.13	0.43±0.52	39	<0.0001
Cyclin D1	0.10±0.04	0.09-0.12	39	0.20±0.07	0.18-0.22	41	<0.0001
Seneszenz							
H3K9me3	0.39±0.18	0.33-0.45	37	0.05±0.09	0-0.11	10	<0.0001
p21 <sup>Cip1</sup>	0.23±0.09	0.20-0.26	39	0.16±0.12	0.12-0.20	42	0.0005
CDKN2A	0.60±0.12	0.56-0.64	40	0.22±0.12	0.18-0.26	42	<0.0001

Tab. 3: Statistische Auswertung der Proliferations- und Seneszenzraten

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Tumormilieu im Peritoneum während der peritonealen Metastasierung des primären kolorektalen Karzinoms Seneszenz und Proliferationsarrest in Tumorzellen fördert.

### 1.3.2 Die peritoneale Metastasierung des primären kolorektalen Karzinoms wird von einer Änderung der Immunzellinfiltration im Tumormilieu begleitet

Um die Immunzellen zu bestimmen, die sich in der Tumorumgebung des primären kolorektalen Karzinoms und der Peritonealkarzinose befinden und somit Einfluss auf die Tumorzellen nehmen, wurden Gewebeproben beider Tumorentitäten im Hinblick auf die Immunzellmarker CD4, CD8, CD57, CD20, CD79a, CD138, CXCR5 und PRG2 immunhistochemisch gefärbt. Der CD4-Rezeptor ist ein Glykoprotein das unter anderem an der Oberfläche von T<sub>H</sub>-Zellen vorkommt, der CD8-Rezeptor ist in der Zellmembran von T<sub>C</sub>-Zellen verankert und das CD57-Antigen wird neben CD56 von aktivierten NK-Zellen exprimiert. Das Antigen CD20 ist ein sich auf der Membranoberfläche von B-Zellen befindendes, glykosyliertes Phosphoprotein. CD79a und CD138 dienen als Oberflächenmarker für Plasmazellen. CXCR5 ist ein Rezeptorprotein, das zur Identifikation von T<sub>FH</sub>-Zellen verwendet wird. Das Protein PRG2 befindet sich in den Granula eosinophiler Granulozyten.

Die Umgebung von Peritonealkarzinose wird von signifikant höheren Zahlen an CXCR5<sup>+</sup> T<sub>FH</sub>-Zellen und CD20<sup>+</sup> B-Zellen beherrscht. Zusätzlich findet sich eine Tendenz zu einer höheren Anzahl an CD79a<sup>+</sup> und CD138<sup>+</sup> Plasma-Zellen im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom. Das primäre kolorektale Karzinom hingegen



zeichnet sich im Vergleich zur Peritonealkarzinose durch signifikant vermehrte  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen und tendenziell erhöhte Werte an  $CD8^+$   $T_C$ -Zellen und  $PRG2^+$  eosinophilen Granulozyten aus (siehe Tab. 4, Abb. 6).

Immunzell-Marker	PC (Zellen/HPF)			KRK (Zellen/HPF)			P
	MW±SD	95% CI	n	MW±SD	95% CI	n	
CXCR5	53±18	41-66	10	21±10	13-29	9	0,0009
CD20	51±32	27-74	10	14±11	6-22	10	0,0029
CD79a	63±43	32-94	10	31±28	11-51	10	0,0544
CD138	45±39	16-73	10	21±20	7-35	10	0,0887
CD4	55±24	38-72	10	286±144	175-397	9	<0,0001
CD8	77±45	44-109	10	124±88	61-187	10	0,2150
PRG2	0±2	0-0	10	1±1	0-2	10	0,0019
CD57	26±11	18-34	10	13±6	9-17	10	0,0068

Tab. 4: Statistische Auswertung der Immunzell-Marker

Durchflusszytometrische Analysen von Gewebeproben aus Peritonealkarzinose und primären kolorektalen Karzinom ergaben ebenfalls erniedrigte Werte für  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Lymphozyten in Peritonealkarzinose im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom.

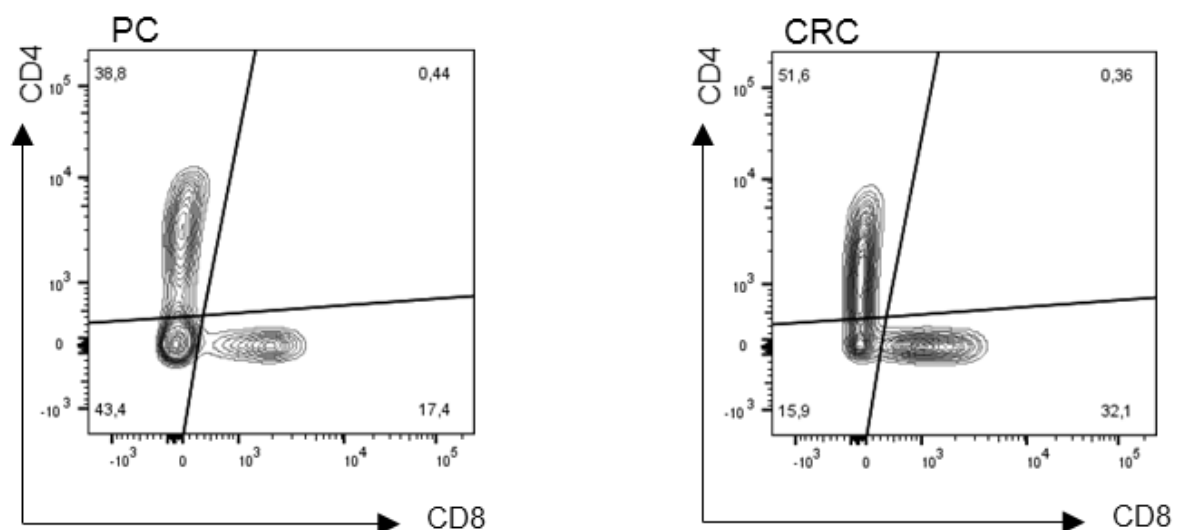


Abb. 5: FACS Analysen von  $CD45^+CD3^+CD4^+$  und  $CD45^+CD3^+CD8^+$  T-Zellen in der Tumorumgebung der Peritonealkarzinose und des primären kolorektalen Karzinoms

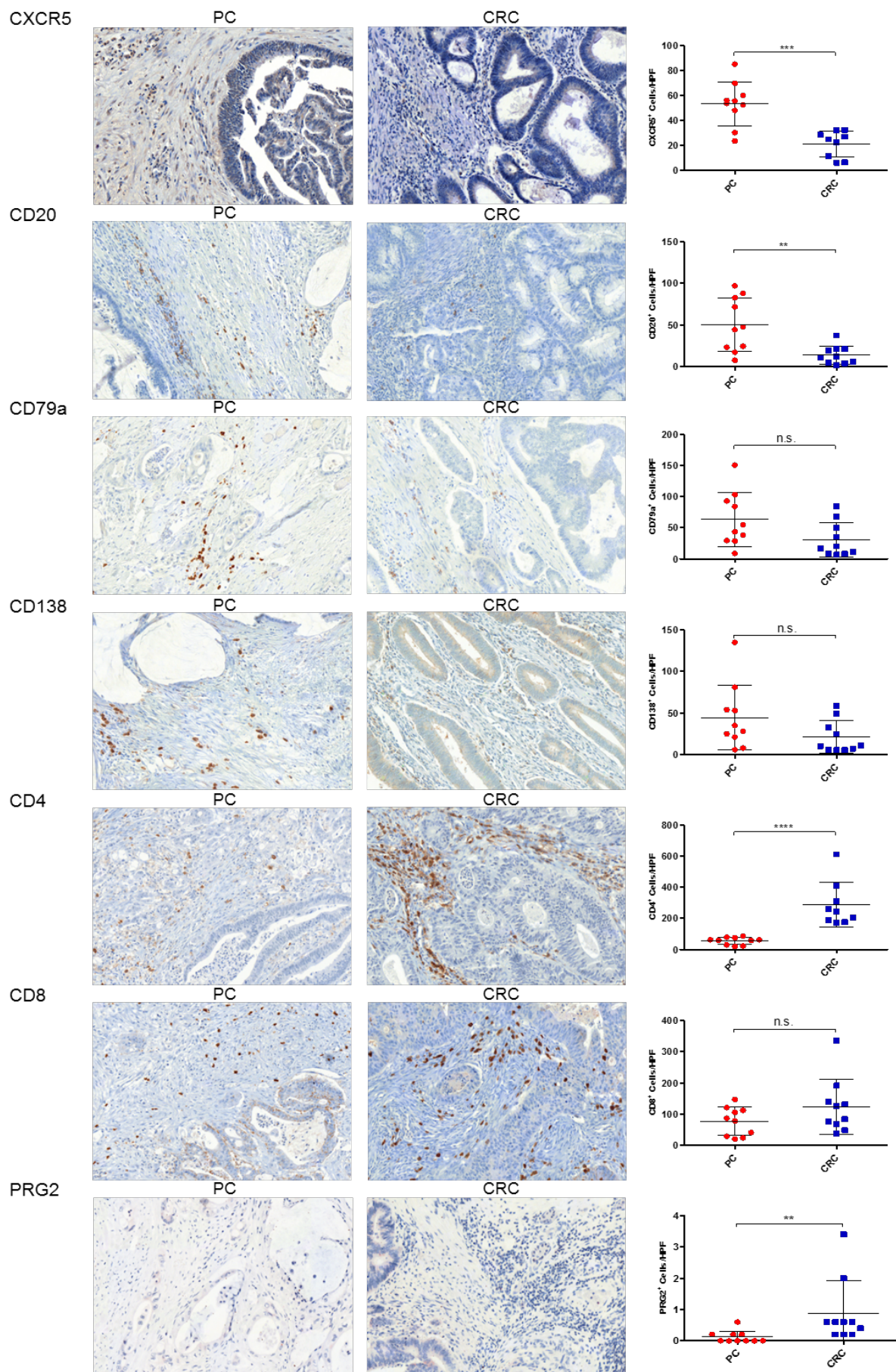


Abb. 6: Immunhistochemische Auswertungen der Immunzellmarker CXCR5, CD20, CD79a, CD138, CD4, CD8 und PRG2



Um diese Ergebnisse zu festigen, wurden PCR Arrays mit Gewebeproben aus Peritonealkarzinose und primären kolorektalen Karzinom durchgeführt. Die verwendeten PCR Arrays detektieren die Expression von 84 Genen, die entweder in der  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zell-Immunantwort oder in dem regulatorischen Netzwerk von  $T_H17$ -Zellen eine bedeutende Rolle spielen. Übereinstimmend mit den immunhistochemischen Ergebnissen zeigen die PCR Arrays in Peritonealkarzinose, im Vergleich mit dem primären kolorektalen Karzinom, eine Herunterregulation des  $T_C$ -Zell-Markers CD8 und des Chemokin Liganden CCL11, der in die Aktivierung und Chemotaxis eosinophiler Granulozyten involviert ist (Abb. 7). Zusätzlich konnte in Peritonealkarzinose eine ausgeprägte Hochregulation des Zytokines IL-15 festgestellt werden. IL-15 fördert die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen.

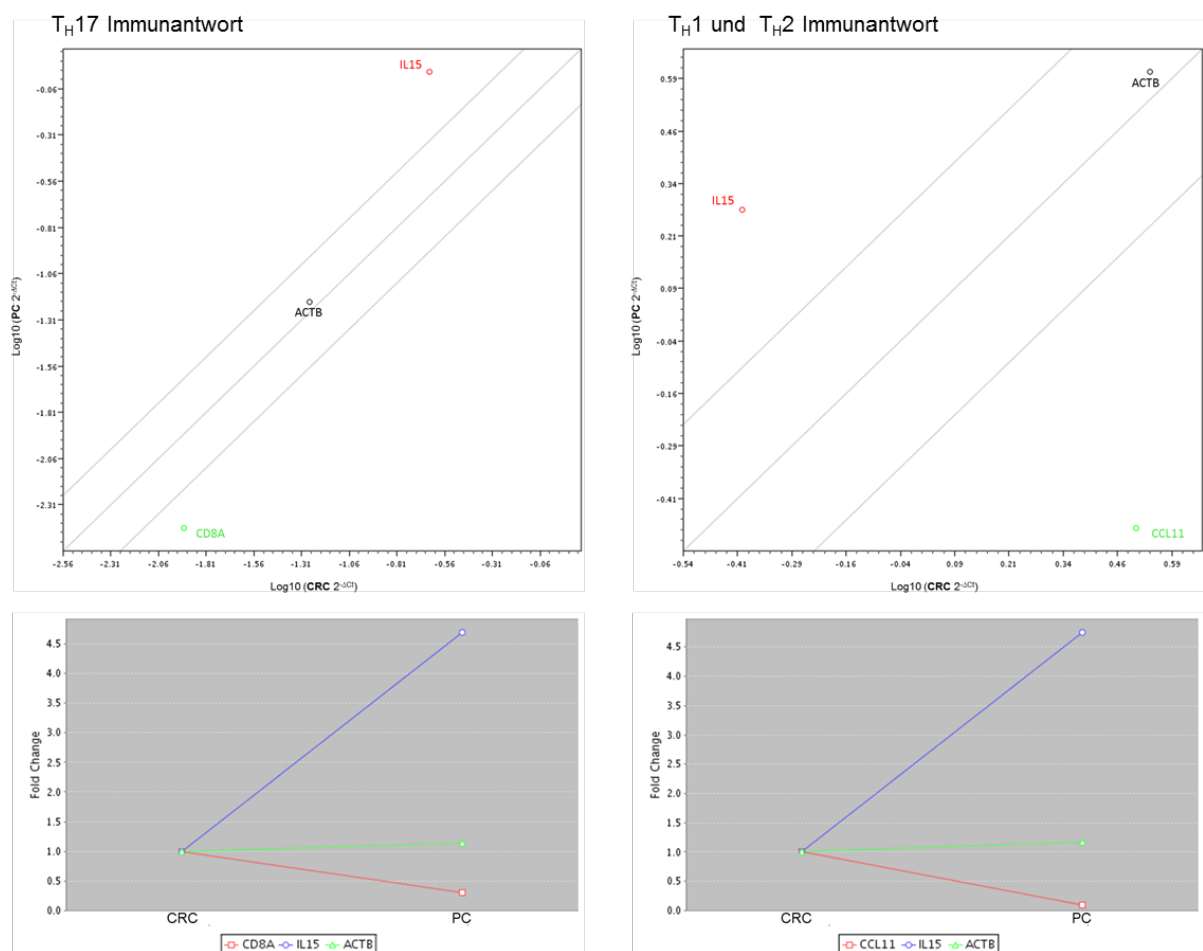


Abb. 7: Ergebnisse für IL-15, CD8 und CCL11 ermittelt durch PCR Arrays der  $T_H1$ -,  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Immunantwort in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

Die immunhistochemischen Färbungen stützen diese Ergebnisse, da sie aufzeigen, dass die Tumorumgebung der Peritonealkarzinose signifikant mehr CD57<sup>+</sup> NK-Zellen aufweist, als die Umgebung des primären kolorektalen Karzinoms (Tab. 4, Abb. 8).

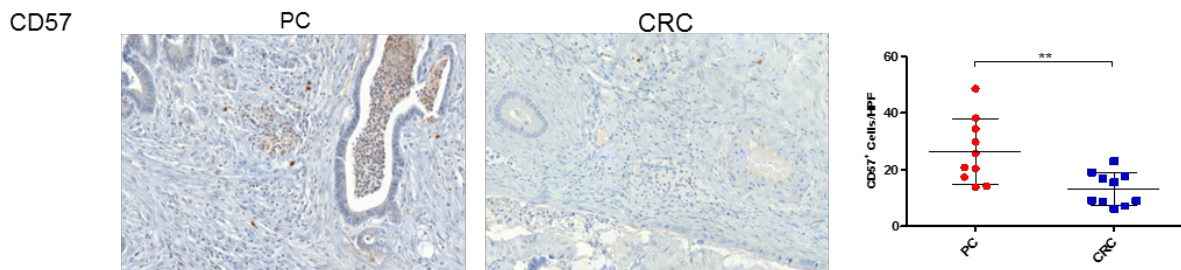


Abb. 8: Immunhistochemische Auswertungen der NK-Zell-Färbung anhand des NK-Zellmarkers CD57 in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

Um zu untersuchen, wie sich die Zytotoxizität der Immunzellen bei örtlichen und zeitlichen Änderungen des Tumormilieus entwickelt, wie es während des Metastasierungsvorganges der Fall ist, wurden FACS Analysen von NK-Zellen in unterschiedlichen Tumorstadien durchgeführt. Dabei wurden das primäre kolorektale Karzinom ohne peritoneale Metastasierung (pCRC), das primäre kolorektale Karzinom mit synchroner Peritonealkarzinose zum Diagnosezeitpunkt (sPC) und metachrone Peritonealkarzinose (mPC) als Untersuchungseinheiten bestimmt. Es zeigt sich, dass synchrone und metachrone Peritonealkarzinose insgesamt eine erhöhte Anzahl an CD56<sup>+</sup> NK-Zellen im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom aufweisen. Im Hinblick auf Zytotoxizität ergeben sich erhöhte Werte an Perforin- und IFN- $\gamma$ -sezernierenden NK-Zellen für synchrone und metachrone Peritonealkarzinose. Zusätzlich findet sich in den NK-Zellen der metachronen Peritonealkarzinose eine erhöhte Expression des Degranulationsmarkers CD107a, der die funktionelle Aktivität von NK-Zellen beschreibt, da CD107a sowohl mit der Zytokinsekretion als auch mit der NK-Zell vermittelten Zell-Lyse korreliert. Somit ergeben die FACS Auswertungen eine erhöhte Expression von zytotoxisch aktiven NK-Zellen in synchroner und metachroner Peritonealkarzinose verglichen mit dem primären kolorektalen Karzinom (Abb. 9).

Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass sich die zelluläre Immunantwort während des Metastasierungsprozesses verändert. Die Tumorimmunität wandelt sich von einem tumor-hemmendem Milieu im primären kolorektalen Karzinom, dass von T<sub>C</sub>-, T<sub>H</sub>-Zellen und eosinophilen Granulozyten beherrscht wird, zu einem Peritonealkarzinose umgebenden Tumormikromilieu, das von B-Zellen und T<sub>FH</sub>-Zellen

geprägt ist und Tumorprogression fördert. Dieser Entwicklung steht eine erhöhte NK-Zell-Zytotoxizität in der Tumorumgebung von Peritonealkarzinose entgegen.

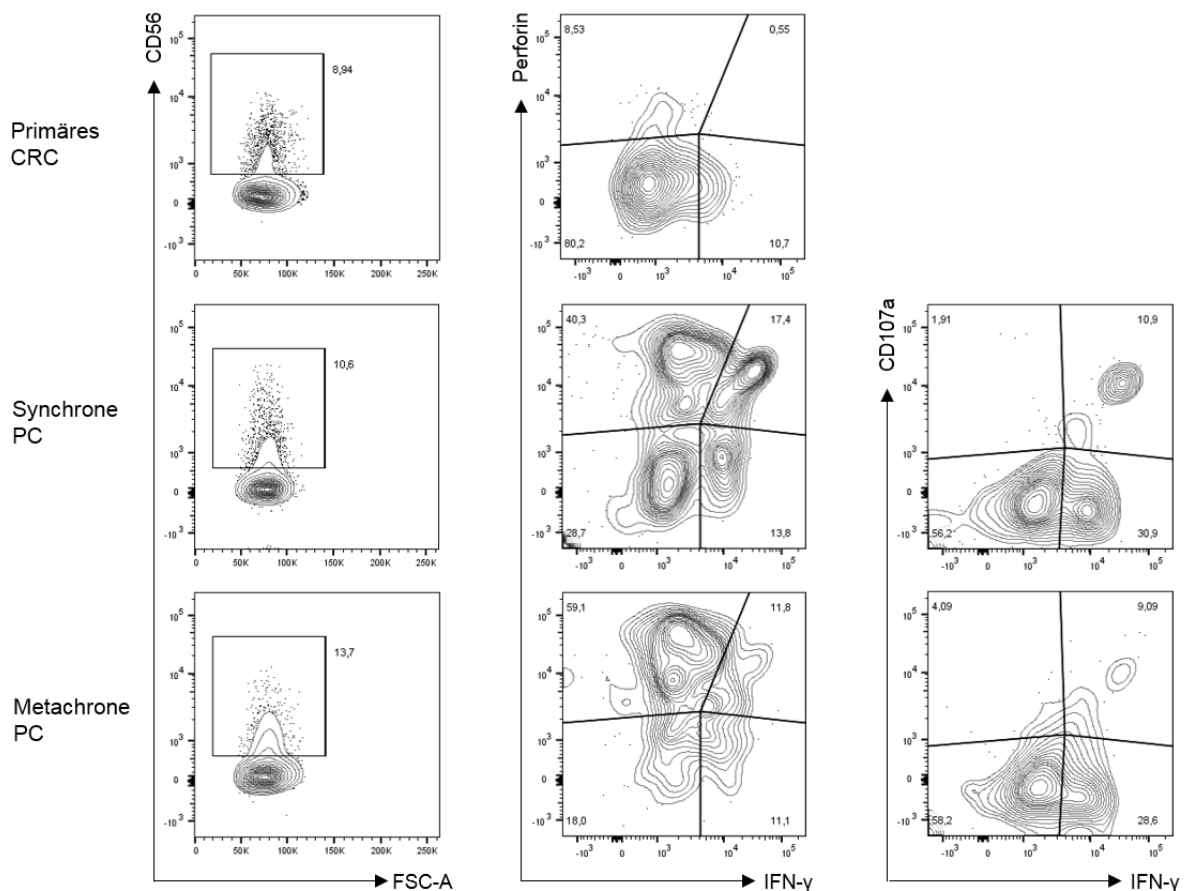


Abb. 9: FACS Analysen des zytotoxischen Potentials von tumorinfiltrierenden NK-Zellen (Zunächst wurden CD56<sup>+</sup> NK-Zellen gated (1. Spalte) und dann hinsichtlich ihrer Perforin & IFN- $\gamma$  (2. Spalte) und CD107a & IFN- $\gamma$  (3. Spalte) Expression untersucht)

### 1.3.3 Nach erfolgter peritonealer Metastasierung ermöglichen erhöhte IFN- $\gamma$ - und TNF-Level im Tumormilieu der Peritonealkarzinose „Immunosurveillance“

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Balance von IL-17 und IFN- $\gamma$  die Tumoraktivität des primären kolorektalen Karzinoms beeinflusst<sup>24,32</sup>. Um herauszufinden, wie die Tumor infiltrierenden Lymphozyten und deren Effektorzytokine die Veränderungen der Zellproliferationsraten im Rahmen der peritonealen Metastasierung des primären kolorektalen Karzinoms beeinflussen, wurden Gewebeproben immunhistochemisch auf IFN- $\gamma$ , IL-17 und Foxp3 gefärbt. IFN- $\gamma$  wird von T<sub>H</sub>1-Zellen, NK-Zellen und ILC1 sezerniert, IL-17 von T<sub>H</sub>17-Zellen und ILC3. Foxp3 wirkt bei der Entstehung von T<sub>reg</sub>-Zellen als wichtiger Transkriptionsfaktor. Die Bedeutung von T<sub>reg</sub>-Zellen in der Pathogenese des primären kolorektalen Karzinoms wurde mehrfach von Forschungsgruppen beschrieben<sup>33,34</sup>. Zusätzlich ist bekannt,

dass die Anwesenheit von  $T_{reg}$ -Zellen in der Umgebung des Primärtumors für die Metastasierung nötig ist<sup>35</sup>. Unsere Forschungsergebnisse lassen eine signifikant erhöhte Anzahl an  $IL-17^+$ -Zellen und  $Foxp3^+$ -Zellen in der Tumorumgebung des primären kolorektalen Karzinoms verglichen mit Peritonealkarzinose erkennen (Abb. 10, Tab. 5).

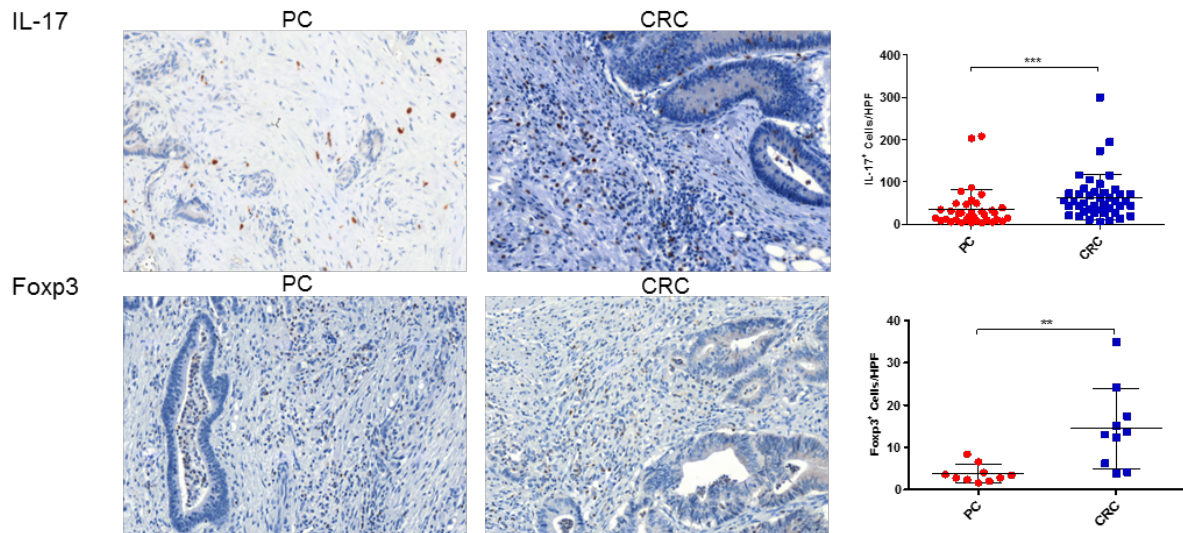


Abb. 10: Immunhistochemische Auswertungen des Effektorzytokins IL-17 und des Transkriptionsfaktors Foxp3 in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

Zusätzlich zeigen FACS Analysen ebenfalls erhöhte Level an  $Foxp3^+$   $T_{reg}$ -Zellen in der Umgebung des primären kolorektalen Karzinoms verglichen mit Peritonealkarzinose (Abb. 11).

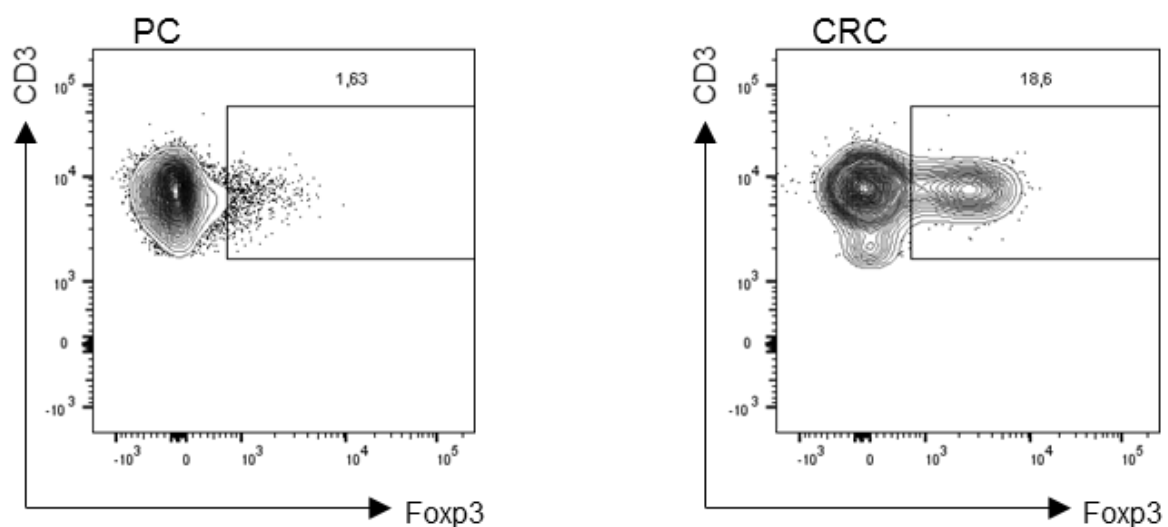


Abb. 11: FACS Analysen von  $CD45^+CD3^+Foxp3^+$  Tumor infiltrierenden Lymphozyten (Zellen wurden auf CD45+ Zellen vorgegattet)

Demgegenüber zeichnet sich das Tumormilieu der Peritonealkarzinose durch eine, im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom, signifikant erhöhte Anzahl an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen aus (Tab. 5, Abb. 12).

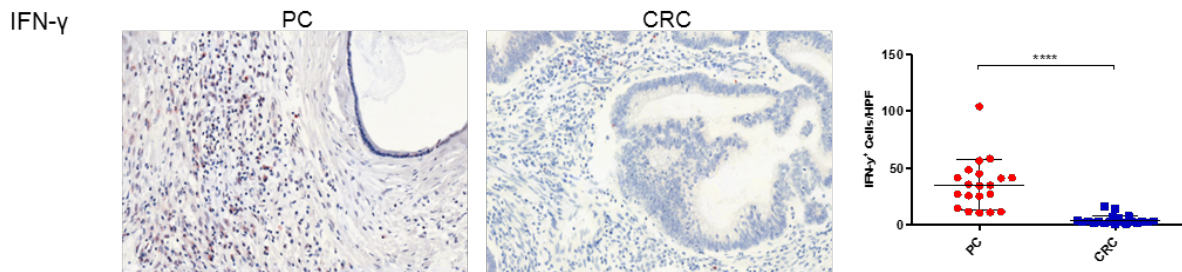


Abb. 12: Immunhistochemische Auswertungen des Effektorzytokins IFN- $\gamma$  in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

Immunzell-Marker	PC (Zellen/HPF)			KRC (Zellen/HPF)			P
	MW $\pm$ SD	95% CI	n	MW $\pm$ SD	95% CI	n	
IL-17	37 $\pm$ 47	21-52	36	64 $\pm$ 54	47-81	43	0,0002
Foxp3	4 $\pm$ 2	2-5	10	14 $\pm$ 9	8-21	10	0,0013
IFN- $\gamma$	35 $\pm$ 22	25-46	20	4 $\pm$ 4	3-6	20	<0,0001

Tab. 5: Statistische Auswertung der Effektorzytokine und Transkriptionsfaktoren

Die durchgeführten PCR-Arrays unterstützen die immunhistochemischen Ergebnisse und zeigen bei Peritonealkarzinose im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom eine Hochregulation der Gene, die für die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF kodieren. Die unterschiedlichen IL-17-Untergruppen (IL17-A, -C, -D, -F) sind bei Peritonealkarzinose und dem primären kolorektalen Karzinom etwa gleich stark ausgeprägt. Unterschiede zeigen sich bei den IL-17-Rezeptoren, welche im primären kolorektalen Karzinom hochreguliert sind (Abb. 13).

Die immunhistologischen und PCR Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Daten zur Balance zwischen IL-17 und IFN- $\gamma$  überein. Es ist bekannt, dass IL-17 die Tumorprogression fördert, IFN- $\gamma$  dagegen tumorhemmend wirkt<sup>36</sup>. Zusätzlich haben Studien von Braumüller et al. gezeigt, dass, in gleichzeitiger Anwesenheit von TNF, IFN- $\gamma$  zur Wachstumshemmung von Tumorzellen durch die Induktion von Seneszenz führen kann<sup>37</sup>. In Übereinstimmung mit dieser Studie weisen unsere Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen hohen IFN- $\gamma$  Werten in der Tumorumgebung und gesteigerten Seneszenzraten der Tumorzellen bei Peritonealkarzinose-Patienten auf (P = 0.035; n = 35). Deshalb kommen wir zu dem

Schluss, dass  $T_H17$ -Zellen und  $T_{reg}$ -Zellen in der Umgebung des Primärtumors die Tumorprogression und den Vorgang der Metastasierung unterstützen. Nachdem eine peritoneale Metastasierung erfolgt ist, wird die lokale „Tumor-Immunosurveillance“ des Immunsystems durch hohe IFN- $\gamma$  und TNF Level vermittelt.

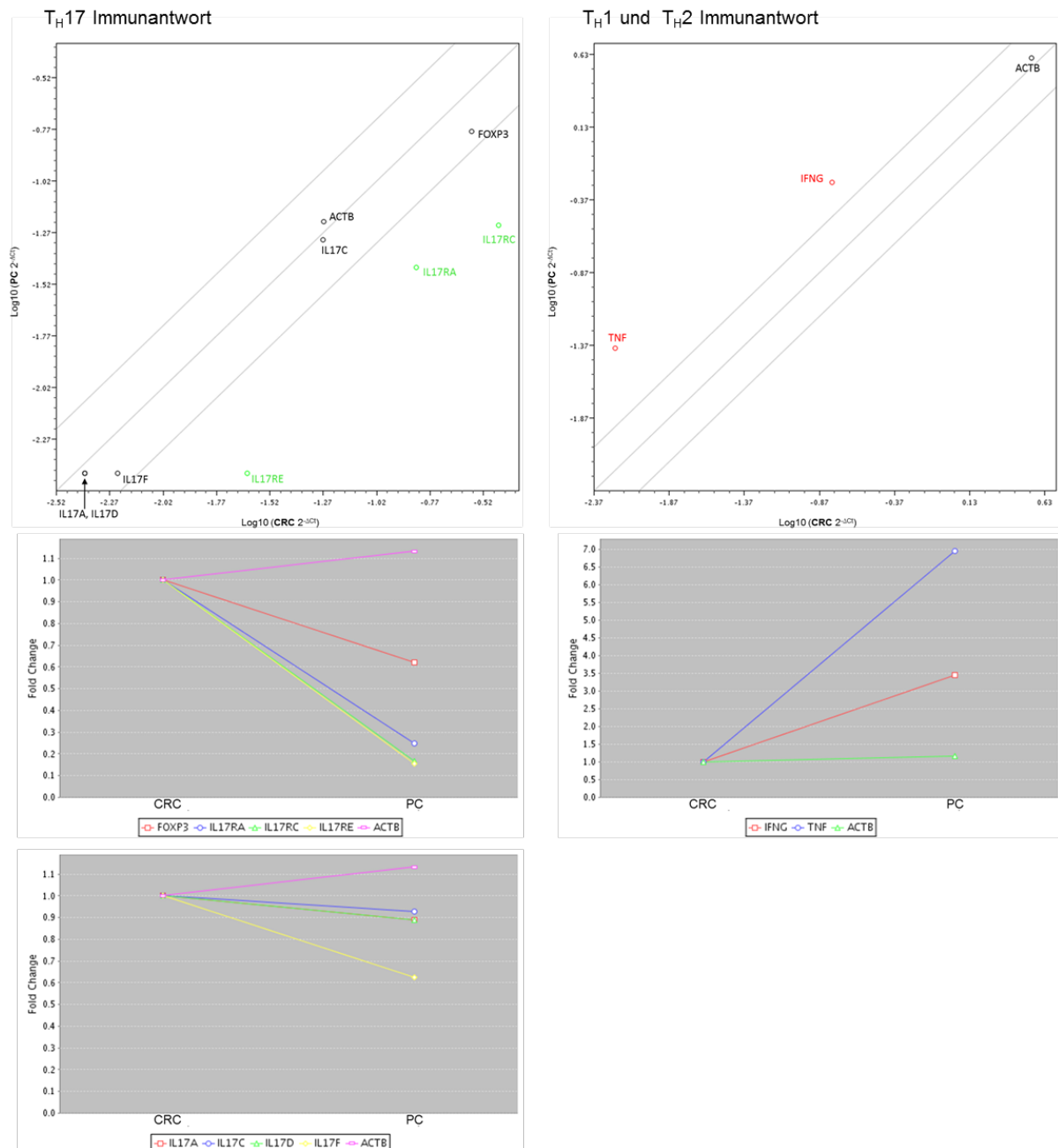


Abb. 13: Ergebnisse für IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17 und IL-17-R in PCR Arrays der  $T_H1$ -,  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Immunantwort in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

### 1.3.4 Das Tumormilieu der Peritonealkarzinose fördert ausgeprägte Gefäßneubildung

Hypoxie fördert Neovaskularisation durch die Induktion von Transkription angiogener Mediatoren und ist deshalb mit Invasivität und Metastasierung von Malignomen



assoziiert. Die oben genannten PCR Arrays zeigen bei dem Vergleich von Peritonealkarzinose mit dem primären kolorektalen Karzinom eine Hochregulation an Genen, die für Angiogenese verantwortlich sind (Abb. 14); namentlich VEGF-A, RUNX1 und CD34. VEGF-A erhöht die Durchlässigkeit der Gefäße, ermöglicht die Induktion von Angiogenese und das Wachstum von Endothelzellen. RUNX1 reguliert die Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu reifen Blutzellen. CD34 ist ein Marker für Stammzellen, der auf hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie Kapillarendothel exprimiert wird. Zusätzlich werden Gene, die für TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 kodieren, vermehrt exprimiert. TGF- $\beta$  beeinflusst die Balance von T<sub>H</sub>17-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen, weist immunsuppressive Effekte auf die Tumorumgebung auf und vermittelt Neovaskularisation.

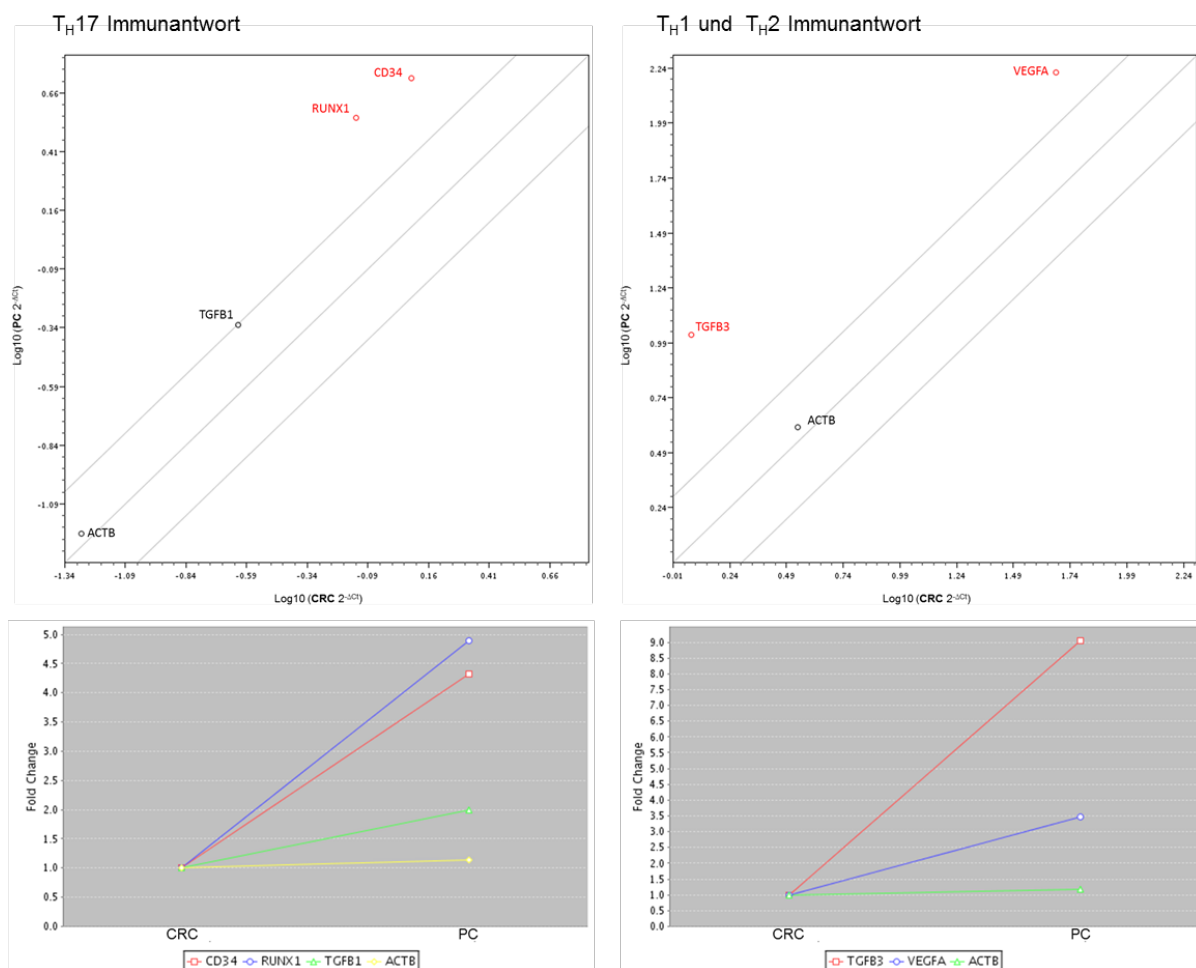


Abb. 14: Ergebnisse der für Angiogenese-relevanten Genen in PCR Arrays der T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Immunantwort in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

Dieses Ergebnis zeigt, dass multiple Faktoren, die für die Angiogenese von Bedeutung sind, in der Umgebung von Peritonealkarzinose vorhanden sind. Um aufzuzeigen, dass diese Faktoren tatsächlich zu vermehrter Gefäßneubildung in

Peritonealkarzinose führen, wurden Gewebeproben immunhistochemisch auf CD34 gefärbt: Peritonealkarzinose ist gekennzeichnet durch eine signifikant vermehrte Angiogenese verglichen mit dem primären kolorektale Karzinom (Abb. 15, Tab. 6).

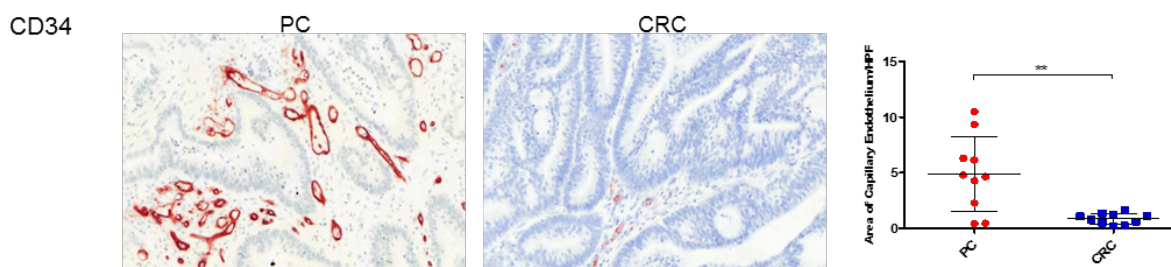


Abb. 15: Immunhistochemische Auswertung der Neovaskularisation in Biopsien der Peritonealkarzinose und des kolorektalen Karzinoms

Angiogenese	PC (Sq Inch/HPF)			KRK (Sq Inch/HPF)			P
	MW±SD	95% CI	n	MW±SD	95% CI	n	
CD34	4,9±3,4	2,5-7,3	10	0,9±0,5	0,5-1,5	10	0,0089

Tab. 6: Statistische Auswertung der Angiogenese

Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass die Tumorzellen der Peritonealkarzinose und das umgebende Immunzellinfiltrat die Produktion von Angiogenese fördernden Faktoren stimulieren. Daraus resultiert eine ausgeprägte Neovaskularisation in der Umgebung der Peritonealkarzinose.

### 1.3.5 Tumorzellteilungsraten der Peritonealkarzinose sind von der Balance zwischen IFN- $\gamma$ und IL-17 beeinflusst

Um zu ergründen, wie das spezielle immunologische Milieu, das Peritonealkarzinose umgibt, die Tumorprogression beeinflusst, wurden die immunhistochemischen Ergebnisse mit den Tumorzellteilungsraten korreliert. Auffallend ist, dass eine erhöhte Anzahl an IL-17<sup>+</sup>-Zellen mit einer erhöhten Tumorzellproliferation bei Peritonealkarzinose einhergeht ( $P = 0.04$ ;  $n = 34$ ). Dagegen korreliert eine erhöhte Anzahl an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen positiv mit vermehrter Seneszenz der Peritonealkarzinose ( $P = 0.035$ ;  $n = 35$ ). Ebenfalls zeigt sich eine negative Korrelation zwischen dem Zellzyklusinhibitor und Seneszenzmarker CDKN2A und dem Marker CD34, der auf kapillärem Endothel exprimiert wird ( $P = 0.026$ ;  $n = 9$ ). Daraus lässt sich folgern, dass entweder Seneszenz oder Neovaskularisation Peritonealkarzinose prägen, abhängig von dem umgebenden Tumormilieu. Bemerkenswerterweise korrelieren weder die Tumorzellproliferation noch die Tumorzellseneszenz mit dem Peritonealkarzinose-Index der Patienten. Somit zeigen weder Seneszenz noch Proliferation der



Tumorzellen einen Zusammenhang mit dem klinischen Ausmaß der Peritonealkarzinose.

Daraus resultiert, dass die Balance der den Tumor umgebenden Immunzellen, abhängig von dem im Tumormilieu vorherrschenden Zytokin, wahrscheinlich die Aggressivität der Peritonealkarzinose beeinflusst.

## 1.4 Diskussion

Der Einfluss des Immunzellinfiltrates auf die Pathogenese<sup>21,38</sup> sowie die Prognose<sup>24,28</sup> des primären kolorektalen Karzinoms ist bereits von vielen Autoren beschrieben. Diese Informationen fehlen, sowohl in Bezug auf die Entstehung, als auch die Tumorprogression von Peritonealkarzinose. Ziel dieser Studie ist es, das immunologische Tumormikromilieu der Peritonealkarzinose und dessen Einfluss auf Neovaskularisation und Tumorzellproliferation zu beschreiben und zu verstehen wie sich dieses Tumormikromilieu während des Metastasierungsvorganges vom primären kolorektalen Karzinom zur Peritonealkarzinose verändert.

Aufgrund der kurzen Lebenserwartung, die mit der Diagnose Peritonealkarzinose einhergeht<sup>31,39</sup>, erwartet man eine hohe Tumorzellproliferationsrate, da diese oft mit aggressiven Malignomen assoziiert ist. Die Auswertung unserer histologischen Ergebnisse ergibt das Gegenteil: Die Tumorzellen in Peritonealkarzinose zeichnen sich durch Proliferationsarrest und signifikant erhöhte Seneszenzraten im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom aus. Zellproliferation ist ein biologischer Prozess, um die Homöostase von Gewebe zu erhalten. In dieser Studie wurde Proliferation mittels den Markern Ki-67, PCNA und Cyclin D1 untersucht<sup>40</sup>. Das Antigen Ki-67 wird von Zellen in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert. Ruhenden Zellen in der G0-Phase fehlt dieses Antigen<sup>41</sup>. PCNA wird während der DNA-Synthese exprimiert und wirkt als Co-Faktor der DNA-Polymerase, welche während der G1-/S-Phase des Zellzyklus erhöht ist<sup>42</sup>. Cyclin D1 ist eine regulatorische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6, deren Aktivität für die Transition von der G1- zur S-Phase benötigt wird<sup>43,44</sup>. Die Auswertung der Proliferationsmarker zeigte jeweils signifikanten Proliferationsarrest der Peritonealkarzinose verglichen mit dem primären kolorektalen Karzinom; dieser kommt vermutlich durch zelluläre Seneszenz zustande. Seneszenten Zellen sind metabolisch aktiv, können allerdings keine DNA-Replikation mehr initiieren und befinden sich dadurch im Wachstumsarrest, meist mit DNA-Gehalt, der typisch für die G1-Phase des Zellzyklus ist. Verursacht wird dieser Vorgang durch die Expression von Zell-Zyklus-Inhibitoren, wie den Cyclin-abhängigen Kinasen p21<sup>Cip1</sup> und CDKN2A<sup>45</sup>. Ein zentrales Kennzeichen von Seneszenz sind Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci (SAHF). SAHF-Regionen zeichnen sich durch Repression von Chromatin aus, wobei die Trimethylierung von Histon 3 Lysin 9 (H3K9me3) detektiert werden kann<sup>46,47</sup>. H3K9me3 spielt eine zentrale Rolle im

Rahmen der T-Zell-vermittelten „Immunosurveillance“ und ist verantwortlich für Immunevasion sowie Progression des Kolonkarzinoms<sup>48</sup>. CDKN2A inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6, verhindert so eine Transition von der G1- in die S-Phase<sup>49,50</sup> und ist ursächlich an der SAHF Formation beteiligt<sup>51</sup>. p21<sup>Cip1</sup> vermittelt den p53-abhängigen Zellarrest in der G1-Phase, indem die Aktivität der Cyclin-anhängigen Kinasen 2 und 4 gehemmt wird<sup>52</sup>. Alle Seneszenzmarker (H3K9me3, CDKN2A, p21<sup>Cip1</sup>) zeigen in Peritonealkarzinose signifikant erhöhte Seneszenzraten. Studien haben ergeben, dass gesteigerte „Immunosurveillance“ zu Tumorzellseneszenz führt<sup>53</sup>.

Das Tumormikromilieu von Peritonealkarzinose ist im Vergleich zu dem des primären kolorektalen Karzinoms von einer signifikant erhöhten Anzahl an NK-Zellen umgeben, begleitet von einer ausgeprägten Hochregulation von IL-15, ein Zytokin, welches für die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen verantwortlich ist. NK-Zellen spielen für die „Tumor-Immunosurveillance“ eine entscheidende Rolle, da sie die Entstehung von Tumoren verhindern, sowie deren Wachstum, Ausbreitung und Wiederauftreten kontrollieren können<sup>54,55</sup>. Die Rezeptoren der NK-Zellen sind in der Lage verschiedene, zu Aktivierung führende Liganden, die auf Krebszellen exprimiert sind, zu binden. Zusätzlich stimuliert die verminderte Expression des MHC-Klasse-I-Komplexes auf Tumorzellen die NK-Zellen zur Apoptose-Induktion der Zielzelle<sup>56</sup>. Dabei werden durch Degranulation der NK-Zellen zytotoxische Granzyme und Perforin frei. Perforin führt zur Perforation der Zellmembran und Formation von Poren. Dadurch tritt unter anderem Granzyme B in die Tumorzelle ein und leitet durch die Aktivierung von Caspasen den programmierten Zelltod ein. Zusätzlich wirkt auch die Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch NK-Zellen zytotoxisch auf Tumorzellen<sup>57</sup>. Es ist bekannt, dass eine ausgedehnte intratumorale Infiltration durch NK-Zellen beim primären kolorektalen Karzinom einen Überlebensvorteil bringt<sup>58</sup>. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die Anzahl der, den Tumor umgebenden, NK-Zellen bei der Metastasierung vom primären kolorektalen Karzinom zur Peritonealkarzinose ansteigt. Diese NK-Zellen sind hoch zytotoxisch aktiv, sezernieren IFN- $\gamma$  und treten zusammen mit einem hohen Niveau an TNF im Tumormikromilieu von Peritonealkarzinose auf. Braumüller et al. haben festgestellt, dass die kombinierte Wirkung von IFN- $\gamma$  und TNF aus T<sub>H</sub>1-Zellen unmittelbar zu dauerhaften Wachstumsarrest in Krebszellen führt<sup>37</sup>. Das beschriebene Zusammenspiel ist demnach eine mögliche Erklärung für die sich

in Seneszenz befindenden Tumorzellen der Peritonealkarzinose und stellt eine durch NK-Zellen vermittelte „Tumor-Immunosurveillance“ dar.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Tumorzellen der Peritonealkarzinose mittels Seneszenz einen Escape-Mechanismus entwickelt haben und so etwa für Chemotherapeutika kaum greifbar sind. Die derzeitigen Behandlungsstrategien mittels Chemotherapeutika, die vorzugsweise auf dem Angriff sich schnell teilender Zellen beruhen, sind bei Peritonealkarzinose nicht so effizient, wie in der Behandlung des primären kolorektalen Karzinoms. Zukünftig könnte deshalb aus Tumorgewebe, welches im Vorfeld im Rahmen einer explorativen Laparotomie entfernt wurde, der Ki-67 Index bestimmt werden. Dieser Index kann als Zellproliferationsmarker zur Abschätzung dienen, welcher der an Peritonealkarzinose erkannten Patienten von einer kompletten zytoreduktiven Resektion mit hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie im Sinne von Langzeitüberleben und Lebensqualität profitieren und für welches Patientengut palliative Chemotherapie oder Best Supportive Care eine adäquate Therapie darstellen. Bei Brustkrebs-Patienten dient die immunhistochemische Evaluation des Antigens Ki-67 bereits erfolgreich der Abschätzung der Krankheitsprognose, sowie der Chemosensibilität des Tumors<sup>59</sup>.

Des Weiteren untersucht diese Studie inwieweit sich das tumorumgebende Immunzellinfiltrat durch den Progress des primären kolorektalen Karzinom zur Peritonealkarzinose verändert. Bindea et al. fanden heraus, dass sich die Immunreaktion mit der Tumorprogression verändert<sup>60</sup>. In frühen Stadien des primären kolorektalen Karzinoms sind T-Zell Untergruppen (CD8, CD3, und CD45RO) stark ausgeprägt, deren Anzahl sinkt allerdings je weiter der Tumor fortschreitet. Dagegen steigt die Dichte an B-Zellen, T<sub>FH</sub>-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen mit der Progression des primären kolorektalen Karzinoms an. Nach der UICC Klassifikation stellt das Vorhandensein von Peritonealkarzinose ein Stadium IV des primären kolorektalen Karzinoms, und somit ein Spätstadium des Malignoms, dar. In Übereinstimmung mit der genannten Studie zeigen unsere Ergebnisse ebenfalls erniedrigte Werte für CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen und CD8<sup>+</sup> T<sub>C</sub>-Zellen, und gleichzeitig eine erhöhte Anzahl an B-Zellen, Plasmazellen und T<sub>FH</sub>-Zellen in Peritonealkarzinose. T<sub>FH</sub>-Zellen bewirken die Differenzierung von antigen-spezifischen B-Zellen zu B-Gedächtniszellen und Plasmazellen. Eine erhöhte T<sub>FH</sub>-Zell-Aktivität ist außerdem mit Lymphom-Entstehung verbunden<sup>61</sup>. B-Zellen fördern Tumorprogression durch die Einleitung

einer STAT3-vermittelte Angiogenese, wie am Beispiel von „B 16 Melanom“- und „Lewis Lung Cancer“-Mausmodellen deutlich wird<sup>62</sup>. Daraus zogen wir den Schluss, dass sich das Tumormikromilieu im Verlauf des Metastasierungsvorganges ändert. Während das Milieu, welches das primäre kolorektale Karzinom umgibt, reich an T<sub>C</sub>- und T<sub>H</sub>-Zellen ist, die das Tumorwachstum eindämmen, wird Peritonealkarzinose vornehmlich von Immunzellen wie B- und T<sub>FH</sub>-Zellen infiltriert, die Tumorwachstum unterstützen. Diesem Vorgang wirkt die NK-Zell-Infiltration der Peritonealkarzinose entgegen. Abhängig davon, ob Tumor fördernde oder Tumor hemmende Immunzellen überwiegen, beeinflusst diese Balance die Zellproliferationsraten der Peritonealkarzinose.

Aus den genannten Ergebnissen ergibt sich die Frage, wie es trotz dem vorwiegend Tumor hemmenden Immunzellinfiltrat, welches das primären kolorektale Karzinom umgibt, zu einer peritonealen Metastasierung kommt. Im Hinblick auf die Immunantwort, die Tumorprogression unterstützt, sind in der Umgebung des primären kolorektalen Karzinoms T<sub>H</sub>17-Zellen, damit verbunden IL-17, sowie Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen signifikant erhöht. Die Anwesenheit von T<sub>H</sub>17-Zellen in der Umgebung des Primärtumors hemmt die antitumorale Immunantwort und ermöglicht Metastasierung<sup>35,63</sup>. Diese Aussage wird gestützt durch ein Kolonkarzinom-Mausmodell, welches zeigt, dass das Fehlen von IL-17 das Auftreten von Metastasen vermindert<sup>64</sup>. Zusätzlich unterdrücken T<sub>reg</sub>-Zellen die Entstehung von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Zellen, woraufhin Tumorwachstum, -invasion und Metastasierung erleichtert werden<sup>65</sup>. Weitere Studien müssen zeigen, welchen Einfluss intestinale Permeabilität und bakterielle Translokation auf die Entstehung von peritonealer Metastasierung haben. Für das primäre kolorektale Karzinom ist bereits bekannt, dass dies zu einer verstärkten Entzündungsreaktion in der Tumorumgebung führt<sup>66</sup>.

Durch die Produktion von systemischen Faktoren wie VEGF-A, TGF- $\beta$  und TNF bewirkt der Primärtumor die Entwicklung von sogenannten prämetastatischen Nischen in tumorfremdem Gewebe<sup>67</sup>. Wie unsere Ergebnisse zeigen, ist das Mikromilieu von Peritonealkarzinose reich an VEGF-A, TGF- $\beta$  und TNF. Diese Zytokin-Zusammensetzung deutet an, dass bereits eine erfolgreiche Bildung einer prämetastatischen Nische stattgefunden hat, woraufhin die Formation einer Metastase erfolgt ist. Dieser Vorgang wird, zum einen durch das Fehlen einer hohen T<sub>H</sub>1-Zell-Dichte bei Peritonealkarzinose unterstützt, die eine epitheliale Tumorstreuung

ermöglicht<sup>68,69</sup>, zum anderen durch das erhöhte Niveau von TNF und TGF- $\beta$ . TNF fördert, wie experimentelle Modelle für Colitis-assoziierte Tumore demonstrieren, Tumorstadium<sup>70,71</sup>. TGF- $\beta$  ermöglicht, über Tumorstadium hinaus, bei fortgeschrittenen Stadien des primären kolorektalen Karzinoms, die Invasion und Metastasierung des Tumors<sup>72-74</sup>. Zusätzlich begünstigen alle genannten Faktoren, sowie die beschriebene hohe Dichte an B-Zellen und T<sub>FH</sub>-Zellen, Neovaskularisation.

Gefäßneubildungen sind für das Wachstum und die Streuung der Tumorzellen von entscheidender Bedeutung. Durch Hypoxie und den TGF- $\beta$ -Signalweg wird die Ausschüttung von angiogenetischen Mediatoren, wie VEGF-A, induziert<sup>75</sup>. Übereinstimmend mit diesem Mechanismus ergeben unsere Versuche signifikant mehr Neovaskularisation in der Tumorumgebung der Peritonealkarzinose. Dieses Resultat legt nahe, dass die Verwendung von VEGF-A-Antikörpern in der Therapie von Peritonealkarzinose ein vielversprechendes Vorgehen darstellt. Ein Mausmodell der Karzinogenese des primären kolorektalen Karzinoms beschreibt, dass VEGF- und EGF-Rezeptor-Antikörper die Tumor vermittelte Angiogenese, das Überleben der gebildeten Endothelzellen und die Entstehung von Aszites mindern<sup>76</sup>. Derzeit finden monoklonale Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab) und EGF-Rezeptoren (Cetuximab), je nach molekularem KRAS- und BRAF-Status der Patienten<sup>77,78</sup>, in der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms Verwendung. Diese Behandlungsstrategien zeigen Nutzen hinsichtlich des Langzeitüberlebens<sup>79-81</sup>. Zusätzlich findet sich in unseren Daten eine negative Korrelation zwischen CD34 positiven kapillären Endothel und hohen Seneszenzraten. Dieses Ergebnis wird gestützt durch eine Studie von Foersch et al., welche aufzeigt, dass ein Fehlen des VEGFR-Signalweges bei primären kolorektalen Karzinom zu vermehrter Seneszenz führt<sup>82</sup>. Die Durchführung weiterer Studien ist nötig, um zu sehen, ob das Hemmen von angiogenetischen Mediatoren bei Peritonealkarzinose-Patienten, die ein hohes Neovaskularisations-Niveau zeigen, zu verbessertem Langzeitüberleben führen kann.

Zusammenfassend demonstrieren die durchgeführten Versuche, dass sich im Zuge der peritonealen Metastasierung des primären kolorektalen Karzinoms das umgebende Tumormikromilieu verändert (Abb. 16). Dieser Vorgang führt bei Peritonealkarzinose zu signifikant erhöhter Seneszenz der Tumorzellen und verminderter Zellproliferation im Vergleich zum primären kolorektalen Karzinom.

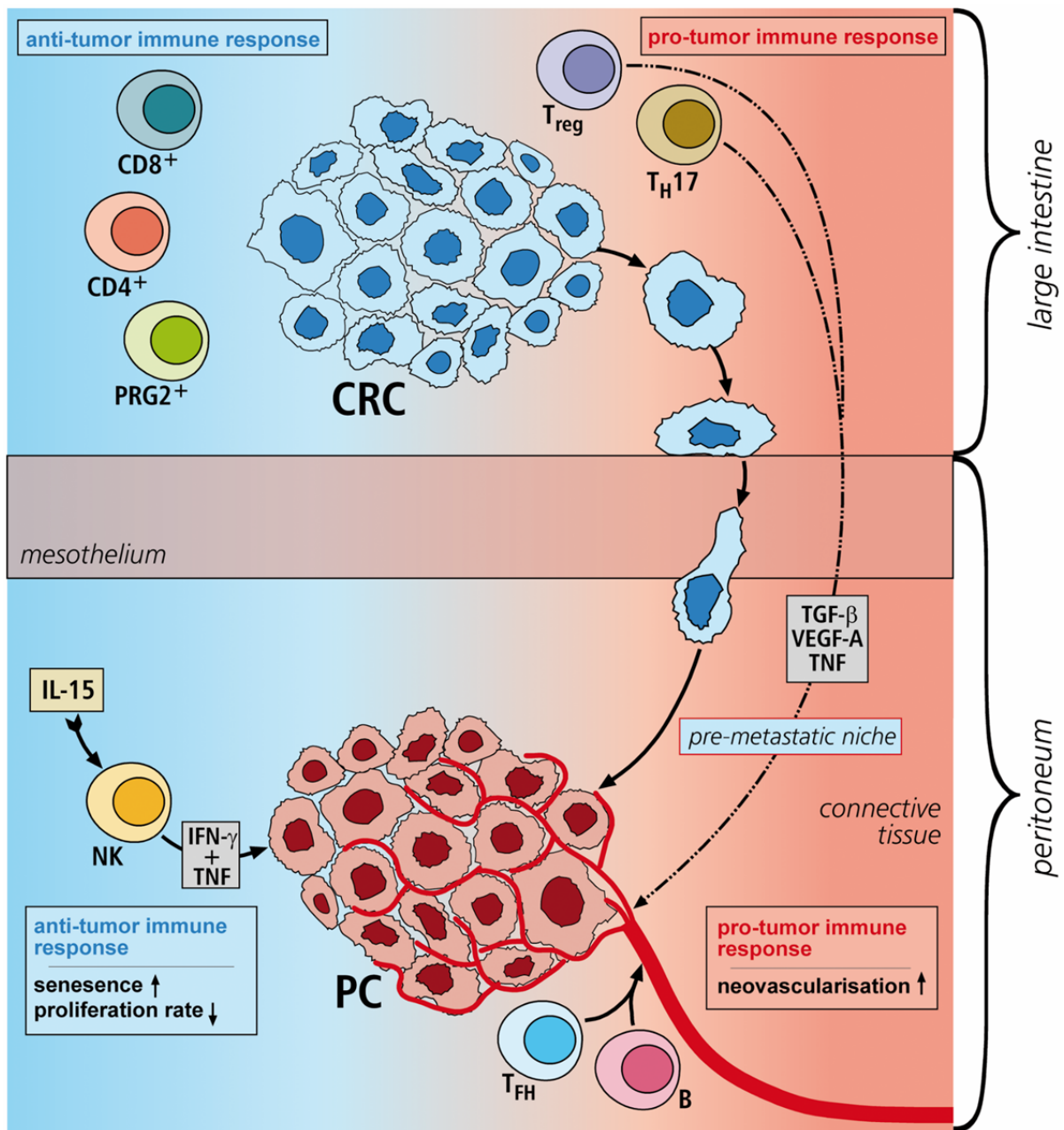


Abb. 16: Überblick über die Immunantwort im Tumormikromileu der Peritonealkarzinose und des primären kolorektalen Karzinoms  
(proliferierende Tumorzellen sind blau, Tumorzellen in Seneszenz rot dargestellt)

## 1.5 Zusammenfassung

Peritonealkarzinose ist eine Metastasierungsform des primären kolorektalen Karzinoms, die mit kurzer Lebenserwartung der Patienten verknüpft ist. Bei Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom haben die Immunzellen der Tumorumgebung Auswirkungen auf Tumorentstehung, -progression, -ausbreitung und den klinischen Outcome. Der Einfluss, den das umgebende Tumormikromilieu auf die Pathogenese der Peritonealkarzinose hat, ist unbekannt. Deshalb wurde das Immunzellinfiltrat der Peritonealkarzinose und dessen Einfluss auf Neovaskularisation und Tumorzellproliferation untersucht und mit dem Verhalten des primären kolorektalen Karzinom verglichen.

Dafür wurden mit Gewebe aus Peritonealkarzinose und primären kolorektalem Karzinom immunhistochemische Färbungen durchgeführt, die Immunzellen, Zytokine, Transkriptionsfaktoren, Zellproliferation, Seneszenz und Angiogenese detektieren. Zusätzlich wurden die so gewonnenen Ergebnisse durch FACS-Analysen und PCR Arrays, die für die Expression von Genen für die  $T_{H1}$ -,  $T_{H2}$ - und  $T_{H17}$ -Immunantwort von Bedeutung sind, gestützt. Alle experimentell erzielten Resultate wurden untereinander korreliert.

Die Tumorzellen der Peritonealkarzinose befinden sich in Proliferationsarrest und vermehrt im Stadium der Seneszenz verglichen mit den Tumorzellen des primären kolorektalen Karzinoms. Gleichzeitig finden sich im Tumormikromilieu von Peritonealkarzinose signifikant erhöhte Raten an IL-15 induzierten, zytotoxisch aktiven, IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen und eine Hochregulation von TNF. Zusätzlich sind signifikant mehr  $T_{FH}$ -Zellen und B-Zellen präsent. Die Umgebung des primären kolorektalen Karzinoms zeigt mehr  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen,  $CD8^+$   $T_C$ -Zellen und eosinophile Granulozyten, denen, im Vergleich zur Peritonealkarzinose, eine signifikant erhöhte Anzahl an IL-17 $^+$   $T_H17$  und Foxp3 $^+$   $T_{reg}$ -Zellen gegenüberstehen. Eine Hochregulation von Genen, die für die Angiogenese verantwortlich sind, wie VEGF-A, TGF- $\beta$  und CD34, führen zu signifikant vermehrter Neovaskularisation bei Peritonealkarzinose verglichen mit dem primären kolorektalen Karzinom. Darüber hinaus korreliert eine erhöhte Menge an IFN- $\gamma^+$ -Zellen in der Umgebung der Peritonealkarzinose positiv mit einer gesteigerten Seneszenzrate der Tumorzellen. Das Vorhandensein von hohen Werten an IL-17 $^+$ -Zellen ist mit erhöhten Tumorzellproliferationsraten verknüpft.



Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass sich die Immunreaktion im Laufe der peritonealen Metastasierung des primären kolorektalen Karzinoms ändert, was zur Induktion der Proliferationsarrest und Seneszenz in den Tumorzellen von Peritonealkarzinose führt. Dabei verändert sich das Tumormikromilieu von vorwiegend Tumor hemmender, T<sub>C</sub>- und T<sub>H</sub>-Zell-vermittelter, Immunantwort in der Umgebung des primären kolorektalen Karzinoms zu B- und T<sub>FH</sub>-Zell-geförderter, Tumorwachstum unterstützender Immunität im Milieu der Peritonealkarzinose. T<sub>H</sub>17-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen, die das primäre kolorektale Karzinom umgeben, unterstützen die Tumorprogression und die Entwicklung von Metastasen. Sobald es zu Metastasierung gekommen ist, fördert eine gesteigerte Produktion an VEGF-A und TGF- $\beta$  eine ausgeprägte Neovaskularisation. Diesem Vorgang steht die NK-Zell-vermittelte „Immunosurveillance“ gegenüber. Die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF führt zu Seneszenz der Tumorzellen. Diese Balance beeinflusst das Fortschreiten und die Aggressivität der Erkrankung und hat möglicherweise einen Einfluss auf das Überleben der Patienten.

**Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing senescence and proliferation arrest in cancer cells**

C.T. Seebauer et al., OncoImmunology, 2016

## 2.1 Published article

ONCOIMMUNOLOGY  
2016, VOL. 0, NO. 0, e1242543 (12 pages)  
<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1242543>



### ORIGINAL RESEARCH

## Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing senescence and proliferation arrest in cancer cells

Caroline Theresa Seebauer<sup>a</sup>, Stefan Brunner<sup>a</sup>, Gabriel Glockzin<sup>a</sup>, Pompiliu Piso<sup>a</sup>, Petra Ruemmele<sup>b</sup>, Hans-Juergen Schlitt<sup>a</sup>, Edward Kenneth Geissler<sup>a</sup>, Stefan Fichtner-Feigl<sup>a,c</sup>, and Rebecca Kesselring<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Surgery, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany; <sup>b</sup>Department of Pathology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany; <sup>c</sup>Regensburg Center of Interventional Immunology, Regensburg, Germany

### ABSTRACT

**Background:** Peritoneal carcinomatosis (PC) is a terminal evolution from primary colorectal cancer (pCRC) associated with poor patient survival. Impact of the immune cell infiltrate on PC pathogenesis is unknown. Therefore, we characterized the immunological tumor microenvironment regarding proliferation, senescence and neovascularization. **Methods:** Formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue of PC and pCRC was examined by immunohistochemistry. Cells infiltrating resected tissue were isolated and analyzed by flow cytometry. PCR arrays detected the expression of genes relevant for helper T (T<sub>H</sub>) cell responses, like T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 response. **Results:** PC tumor cells demonstrate significantly lower proliferation rates than pCRC, but show significantly more senescence. PC is surrounded by significantly increased numbers of cytotoxic active Natural Killer (NK) cells, follicular helper T cells (T<sub>FH</sub>) and B cells, whereas pCRC shows more CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> cells, CD8<sup>+</sup> cytotoxic T (T<sub>C</sub>) cells, eosinophilic granulocytes, T<sub>H</sub>17 and regulatory T (T<sub>reg</sub>) cells. PC is characterized by significantly increased interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), an upregulation of tumor necrosis factor (TNF) and the NK cell-regulating cytokine interleukin-15 (IL-15). An upregulation of angiogenesis-related genes, like vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), leads to severe neovascularization in PC. Correlations of PC results reveal that elevated numbers of interleukin-17 (IL-17) positive cells are associated with high cancer cell proliferation, whereas high numbers of IFN $\gamma$  positive cells correlate with more tumor cells in senescence. **Conclusion:** The cellular immune reaction is modified during metastasis, inducing senescence in PC tumor cells. Immune surveillance in PC is facilitated by NK cells and high levels of IFN $\gamma$  and TNF. Counteracting this effect, T<sub>FH</sub> and B cells combined with VEGF-A enhancement promote neovascularization in PC (Illustration 1).

### GRAPHICAL ABSTRACT

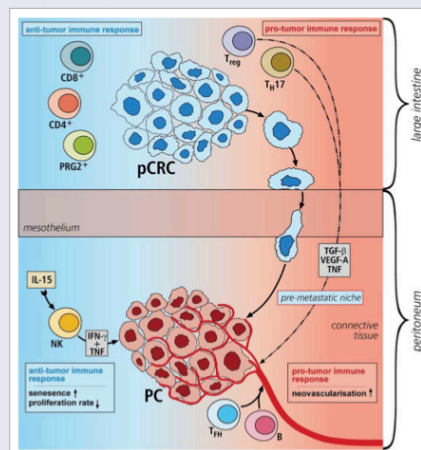


Illustration 1. Overview of immune response in primary CRC and PC.

### ARTICLE HISTORY

Received 29 June 2016  
Revised 21 September 2016  
Accepted 23 September 2016

### KEYWORDS

Peritoneal carcinomatosis;  
proliferation; senescence;  
tumor milieu; T<sub>H</sub>1; T<sub>H</sub>17

**CONTACT** Rebecca Kesselring [rebecca.kesselring@ukr.de](mailto:rebecca.kesselring@ukr.de) Department of Surgery, University Medical Center Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, Regensburg, 93053, Germany.

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2016 Taylor & Francis Group, LLC

During metastasis from primary CRC to PC the immune cell infiltrate changes, accompanied by the induction of senescence in PC cancer cells (marked red): In pCRC, the antitumor immune response is facilitated by CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub> cells, CD8<sup>+</sup>T<sub>C</sub> cells and PRG2<sup>+</sup> eosinophilic granulocytes. The premetastatic niche development is promoted by T<sub>reg</sub> cells and T<sub>H</sub>17 cells producing systemic factors like VEGF-A, TGF- $\beta$  and TNF. Along with T<sub>HH</sub> and B cells, as with a pro-tumor immune response, they support metastatic formation and lead to severe neovascularization in PC. This is counterbalanced by the IL-15-induced activation and proliferation of NK cells. The secreted cytokines IFN $\gamma$  and TNF mediate immunosurveillance.

**Abbreviations:** ACTB,  $\beta$ -actin; AEC, 3-amino-9-ethylcarbazole; B, B cells; CCL11, chemokine ligand 11; CD, cluster of differentiation; CDK, cyclin dependent kinase; CDKN2A, cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A; CI, confidence interval; CRS, cytoreductive surgery; CXCR5, CXC chemokine receptor 5; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorhydrate; DNA, DNA; EGF, epidermal growth factor; FACS, fluorescence activated cell sorting; FCS, fetal calf serum; FFPE, formalin-fixed and paraffin-embedded; Foxp3, forkhead box P3; H3K9me3, tri-methyl-histone H3; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; HIPEC, hyperthermic intraperitoneal chemotherapy; HPF, high-power field; HRP, horseradish peroxidase; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; ILC, innate lymphoid cells; IL-15, interleukin-15; Ki-67, Ki-67; mRNA, mRNA; MHC, major histocompatibility complex; NK cells, natural killer cells; PC, peritoneal carcinomatosis; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCR, polymerase chain reaction; pCRC, primary colorectal cancer; PRG2, proteoglycan 2; p21<sup>Cip1</sup>, cyclin-dependent kinase inhibitor 1; RNA, ribonucleic acid; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; RUNX1, runt-related transcription factor 1; SD, standard deviation; STAT, signal transducers and activators of transcription; T<sub>C</sub> cells, cytotoxic T cells; T<sub>HH</sub> cells, follicular helper T cells; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; T<sub>H</sub> cells, helper T cells; TNF, tumor necrosis factor; T<sub>reg</sub> cells, regulatory T cells; UICC, union internationale contre le cancer; VEGF-A, vascular endothelial growth factor-A

## Introduction

Peritoneal carcinomatosis (PC) is a frequent terminal evolution from primary colorectal cancer (pCRC).<sup>1</sup> Current multimodal therapies contain the combination of cytoreductive surgery, hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and systemic chemotherapy, but cannot provide consistent long-term survival.<sup>2-4</sup> Currently, no marker exists to predict which patients benefit from these aggressive treatments.

PC develops from tumor propagation per continuitatem or due to contamination during resection of the primary tumor. Neoplastic cells spread transcoelomic, attach to the mesothelial surface and invade the peritoneal surface to become vascularized.<sup>5</sup> Especially the postoperative inflammation and the immunological modifications involved in wound healing seem to aggravate the implantation of tumor cells.<sup>6</sup>

"Tumor-promoting inflammation" and "avoiding immune destruction" are emerging hallmarks of cancer<sup>7</sup> and the link between tumor-associated inflammation and tumor progression is recognized.<sup>8</sup> In pCRC, a distinct immune response is involved in tumor development and progression.<sup>9</sup> The production of pro-inflammatory cytokines potentially leads to mutations in oncogenes and tumor suppressor genes (Adenomatous polyposis coli (APC) gene, tumor suppressor p53 and Kirsten rat sarcoma viral oncogene (KRAS)).<sup>10</sup> Immunosurveillance is executed by cytotoxic T (T<sub>C</sub>) cells, natural killer (NK) cells and helper T (T<sub>H</sub>) cells.<sup>10</sup> In this regard, coordinated T<sub>H</sub>1 and T<sub>C</sub> lymphocyte infiltration in pCRC is associated with favorable clinical outcome,<sup>11,12</sup> whereas infiltration with T<sub>H</sub>17 cells is linked to poor prognosis.<sup>13</sup>

The impact of immune cells on pCRC tumorigenesis and prognosis is recognized, but unclear for PC of colorectal origin. Therefore, we characterized the microenvironment of PC compared with pCRC. This study demonstrates that the cellular immune reaction is modified during peritoneal metastasis, inducing senescence in PC tumor cells.

## Results

### *Cancer cells of peritoneal carcinomatosis show less proliferation and increased senescence*

Since the impact of the tumor microenvironment on PC tumorigenesis is unclear, we determined proliferation and senescence by immunohistochemical staining. To evaluate proliferation rates (PR) Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D1 were used as markers. Senescence rates (SR) were determined by the senescence markers tri-methyl-histone H3 (H3K9me3), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21<sup>Cip1</sup>) and cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A (CDKN2A), which codes for the protein p16<sup>INK4A</sup>. With PC patients having a short-life expectancy, we expected highly proliferating cancer cells, which are often a feature of aggressive cancers.<sup>14</sup> Surprisingly, our results revealed the contrary, where tumor cells in PC demonstrate significantly lower PR than tumor cells in pCRC, but show significantly higher numbers of senescent cells (Table 1) (Figs. 1A and B; for 10 $\times$  magnification of all immunohistochemical staining see Supporting Figs. 1A–O). A positive correlation between the two markers for proliferation Ki-67 and cyclin D1 emphasizes the concordance of these results ( $p = 0.034$ ;  $n = 34$ ). These findings indicate that the tumor microenvironment in the peritoneum facilitates senescence in cancer cells after metastasis of pCRC to PC has occurred.

### *Metastasis of primary colorectal cancer to peritoneal carcinomatosis is accompanied by distinct changes in the immune cell infiltrate*

To determine the immune cell infiltrate of the tumor microenvironment, human samples of PC and pCRC were stained for cluster of differentiation 4 (CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>, CD20, CD79a, CD138, CXC chemokine receptor 5 (CXCR5) and proteoglycan 2 (PRG2) by immunohistochemistry. The PC tumor microenvironment is dominated



**Table 1.** Significantly lower proliferation and significantly higher senescence rates in PC cancer cells compared with pCRC.

Cell Division Rate	PC (Rate/HPF)			pCRC (Rate/HPF)			p
	Mean $\pm$ SD	95% CI	n	Mean $\pm$ SD	95% CI	n	
<b>Proliferation</b>							
Ki-67	0.16 $\pm$ 0.10	0.12–0.19	35	0.30 $\pm$ 0.15	0.24–0.37	23	0.0006
PCNA	0.17 $\pm$ 0.10	0.14–0.21	39	0.48 $\pm$ 0.13	0.43 $\pm$ 0.52	39	<0.0001
Cyclin D1	0.10 $\pm$ 0.04	0.09–0.12	39	0.20 $\pm$ 0.07	0.18–0.22	41	<0.0001
<b>Senescence</b>							
H3K9me3	0.39 $\pm$ 0.18	0.33–0.45	37	0.05 $\pm$ 0.09	0–0.11	10	<0.0001
p21 <sup>Cip1</sup>	0.23 $\pm$ 0.09	0.20–0.26	39	0.16 $\pm$ 0.12	0.12–0.20	42	0.0005
CDKN2A	0.60 $\pm$ 0.12	0.56–0.64	40	0.22 $\pm$ 0.12	0.18–0.26	42	<0.0001

Abbreviations: PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; Rate, ratio of positive stained cancer cells divided by all cancer cells; HPF, high-power field; SD, standard deviation; CI, confidence interval; Ki67, PCNA and cyclin D1 as proliferation markers; H3K9me3, p21<sup>Cip1</sup> and CDKN2A as senescence markers.

by significantly higher numbers of CXCR5<sup>+</sup> follicular helper T (T<sub>FH</sub>) cells, CD20<sup>+</sup> B cells and a tendency to more CD79a<sup>+</sup> and CD138<sup>+</sup> plasma cells in comparison with pCRC. Whereas pCRC shows significantly higher levels of CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> cells, and also elevated levels of CD8<sup>+</sup> T<sub>C</sub> cells and PRG2<sup>+</sup> eosinophilic granulocytes compared with PC (Table 2) (Figs. 2A–F). Fluorescence activated cell sorting (FACS) analyses of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> expression support these findings (Supporting Fig. 2A). To verify these results polymerase chain reaction (PCR) arrays were performed (Figs. 3A and B; for summary of all PCR array results see Supporting Figs. 3A–D). Concordant with our immunohistochemistry results arrays revealed a downregulation of the T<sub>C</sub> cell marker CD8A and chemokine ligand 11 (CCL11) in PC, compared with pCRC. CCL11 is able to activate eosinophils and induce eosinophilic chemotaxis. In addition, the arrays reveal strong upregulation of interleukin-15 (IL-15) in PC, compared with pCRC. IL-15 regulates NK cell activation and proliferation. In this regard, via immunohistochemistry, we were able to show that the area surrounding PC is dominated by significantly higher numbers of CD57<sup>+</sup> NK cells, compared with pCRC (Table 2) (Fig. 4A).

To investigate how cytotoxicity evolves regarding spatiotemporal changes of the tumor microenvironment, FACS analyses of NK cells in different tumor stages were performed. Primary CRC without metastasis (pCRC), primary CRC with synchronous PC by time of diagnosis (sPC), and metachronous PC (mPC) were tested as different entities. First, overall increased numbers of CD56<sup>+</sup> NK cells in sPC and mPC, compared with pCRC, are detectable (Fig. 4B). Regarding cytotoxicity of NK cells, augmented perforin<sup>+</sup> and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-secreting CD56<sup>+</sup> cells were located in sPC and mPC. Additionally, NK cells in sPC and mPC showed expression of the degranulation marker CD107a (Supporting Fig. 2C). These findings demonstrate substantially more cytotoxic active NK cells are present in synchronous and metachronous PC, compared with primary CRC.

In summary, cellular immune reactions are modified in the process of metastasis. Tumor immunity changes from a T<sub>H</sub> and T<sub>C</sub> cell-dominated antitumor immune response in pCRC to a B and T<sub>FH</sub> cell-mediated pro-tumor immune response in PC, counterbalanced by cytotoxic effects executed by NK cells.

### After metastatic formation tumor immune surveillance is facilitated by high levels of IFN $\gamma$ and TNF

Previous studies show that the balance of IL-17 and IFN $\gamma$  affects tumor activity of colitis-associated CRC.<sup>15,16</sup> To identify cytokines potentially influencing cancer cell division rates, human samples of PC and pCRC were stained for IFN $\gamma$ , IL-17A and forkhead box P3 (Foxp3). Foxp3 functions as a transcription factor of regulatory T (T<sub>reg</sub>) cells, which play a role in CRC pathogenesis and metastasis.<sup>17,18</sup> IL-17 promotes tumorigenesis, whereas IFN $\gamma$  acts against tumors.

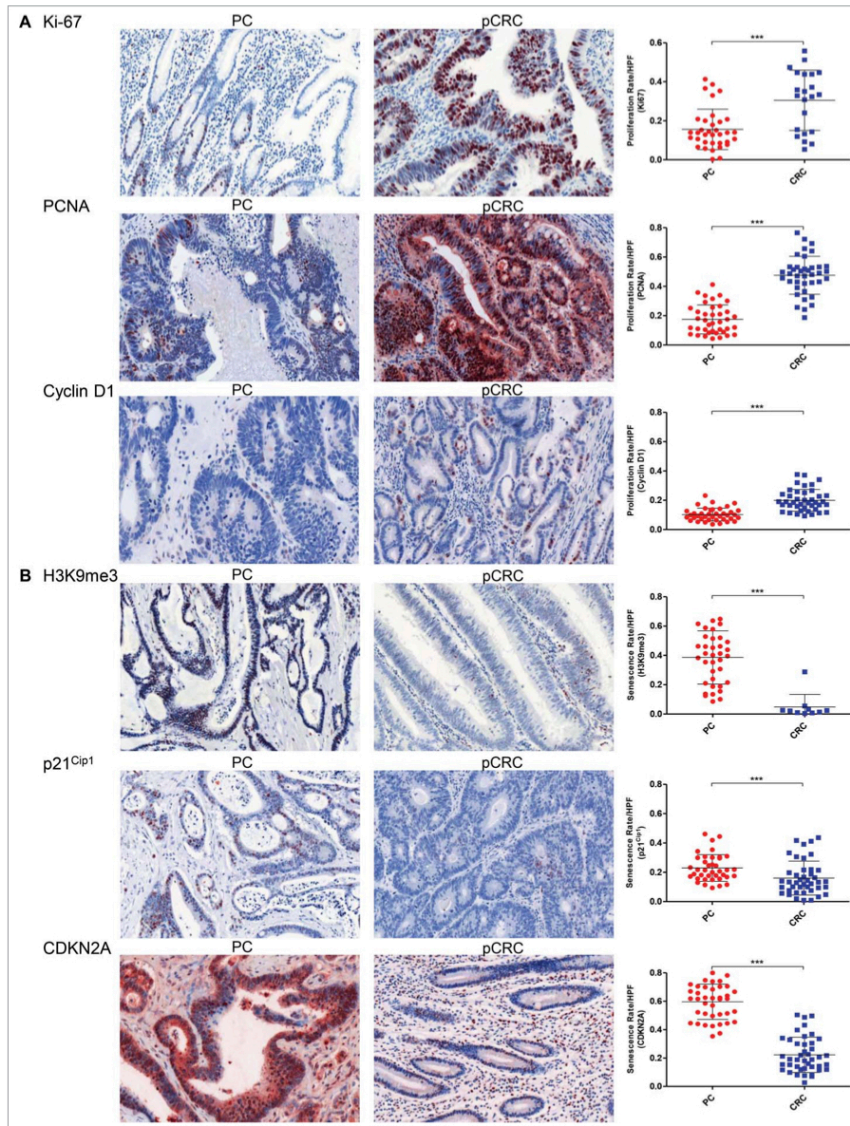
Primary CRC reveals significantly higher levels of IL-17<sup>+</sup>T<sub>H</sub>17 cells and Foxp3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> cells than PC (Table 2) (Figs. 5A and B). FACS analyses of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> lymphocyte expression (Supporting Fig. 2B) and PCR array results (Fig. 3A) support these findings. In contrast, PC shows significantly increased numbers of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells, compared with pCRC (Table 2) (Fig. 5C). We verified these results with PCR arrays (Figs. 3A and B), demonstrating an upregulation of genes encoding for IFN $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF) in PC. The different IL-17 subtypes (IL17-A, -C, -D, -F) are present at the same levels in both groups, but their receptors (IL-17R) are upregulated in pCRC compared with PC.

In the presence of TNF, IFN $\gamma$  leads to growth arrest by inducing senescence in tumor cells.<sup>19</sup> In support of this idea, we were able to show a significant positive correlation between patients with high levels of IFN $\gamma$  and increased numbers of senescent cells ( $p = 0.035$ ;  $n = 35$ ).

Therefore, T<sub>H</sub>17 and T<sub>reg</sub> cells at the primary tumor site (pCRC) seem to support tumor progression and metastasis. After metastatic formation has occurred (PC), local tumor immune surveillance is facilitated by high levels of IFN $\gamma$  and TNF.

### Severe neovascularization characterizes the peritoneal carcinomatosis tumor microenvironment

Tumor metastasis and invasiveness is associated with neovascularization induced by hypoxia. The above mentioned PCR arrays reveal an upregulation of angiogenesis-related genes like vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), CD34, runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and TGF- $\beta$ 3 in samples of PC (Figs. 3A



**Figure 1.** High senescence and low proliferation rates of tumor cells in peritoneal carcinomatosis. (A) Immunohistochemical staining for Ki-67, PCNA and cyclin D1 reveal significantly lower tumor cell proliferation rates in PC ( $n = 35$  (Ki-67),  $n = 39$  (PCNA),  $n = 39$  (cyclin D1)) compared with pCRC ( $n = 23$  (Ki-67),  $n = 39$  (PCNA),  $n = 41$  (cyclin D1)). (B) H3K9me3, p21<sup>Cip1</sup> and CDKN2A staining reveal a significantly higher tumor cell senescence rates in PC ( $n = 37$  (H3K9me3),  $n = 39$  (p21<sup>Cip1</sup>),  $n = 40$  (CDKN2A)) compared with pCRC ( $n = 10$  (H3K9me3),  $n = 42$  (p21<sup>Cip1</sup>),  $n = 42$  (CDKN2A)). Proliferation rates and senescence rates are defined by the ratio of positive stained cancer cells to all cancer cells per HPF. Cells were counted in five HPF per patient (20  $\times$  magnification; Mean and SD are marked in graph; \*\*\* $p \leq 0.001$ ); PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; HPF, high-power field.

and B). TGF- $\beta$  mediates neovascularisation and influences the balance of T<sub>H</sub>17 and T<sub>reg</sub> cells. RUNX1 regulates the differentiation of haematopoietic stem cells into mature blood cells. VEGF-A increases vascular permeability and induces

angiogenesis. CD34 is expressed on capillary endothelium and haematopoietic precursors. To prove that PC is more vascularized than pCRC, human samples were stained for CD34. PC reveals significantly more angiogenesis than pCRC (Table 3)



**Table 2.** Significant differences in the immune cell infiltrate and the effector cytokines of PC compared with pCRC.

Immune Cells	Markers	PC (Cells/HPF)			pCRC (Cells/HPF)			p
		Mean $\pm$ SD	95% CI	n	Mean $\pm$ SD	95% CI	n	
T <sub>H1</sub> cells	CXCR5	53 $\pm$ 18	41–66	10	21 $\pm$ 10	13–29	9	0.0009
B cells	CD20	51 $\pm$ 32	27–74	10	14 $\pm$ 11	6–22	10	0.0029
Plasma cells	CD79a	63 $\pm$ 43	32–94	10	31 $\pm$ 28	11–51	10	0.0544
	CD138	45 $\pm$ 39	16–73	10	21 $\pm$ 20	7–35	10	0.0887
T <sub>H2</sub> cells	CD4	55 $\pm$ 24	38–72	10	286 $\pm$ 144	175–397	9	<0.0001
T <sub>C</sub> cells	CD8	77 $\pm$ 45	44–109	10	124 $\pm$ 88	61–187	10	0.2150
Eosinophils	PRG2	0 $\pm$ 2	0–0	10	1 $\pm$ 1	0–2	10	0.0019
NK cells	CD57	26 $\pm$ 11	18–34	10	13 $\pm$ 6	9–17	10	0.0068
T <sub>reg</sub>	Foxp3	4 $\pm$ 2	2–5	10	14 $\pm$ 9	8–21	10	0.0013
Cytokines	IL-17	37 $\pm$ 47	21–52	36	64 $\pm$ 54	47–81	43	0.0002
	IFN $\gamma$	35 $\pm$ 22	25–46	20	4 $\pm$ 4	3–6	20	<0.0001

Abbreviations: PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; HPF, high-power field; SD, standard deviation; CI, confidence interval; T<sub>H1</sub>, follicular helper T cells; T<sub>H2</sub>, helper T cells; T<sub>C</sub>, cytotoxic T cells; NK, natural killer cells; T<sub>reg</sub>, regulatory T cells; IL-17, interleukin-17; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ .

(Fig. 5D). These results demonstrate that PC tumor cells and the surrounding immune infiltrate stimulate the production of angiogenic factors, resulting in severe neovascularization.

#### Tumor cell division rates of peritoneal carcinomatosis are influenced by the balance of IFN $\gamma$ and IL-17

To investigate how the unique immunological tumor microenvironment of PC impacts tumor progression, immunohistochemical results were correlated with tumor cell senescence and proliferation. Remarkably, elevated IL-17 levels in PC show a significant positive correlation with increased tumor cell PR ( $p = 0.04$ ;  $n = 34$ ), whereas high levels of IFN $\gamma$  demonstrate a significant positive correlation with elevated levels of senescent cells ( $p = 0.035$ ;  $n = 35$ ). Furthermore, statistical analyses of PC samples revealed a negative correlation between the cell-cycle inhibitor and marker for senescence CDKN2A and the marker for capillary endothelium CD34 ( $p = 0.026$ ;  $n = 9$ ). This suggests, depending on the tumor microenvironment, either severe neovascularization or senescent tumor cells dominate PC. Proliferation and SR were independent of PC extent, as neither Ki-67 nor H3K9me3 correlated with patient peritoneal cancer index. Therefore, the balance of IL-17 and IFN $\gamma$  influences tumor cell division rates and tumor progression, depending on the most predominant cytokine.

#### Discussion

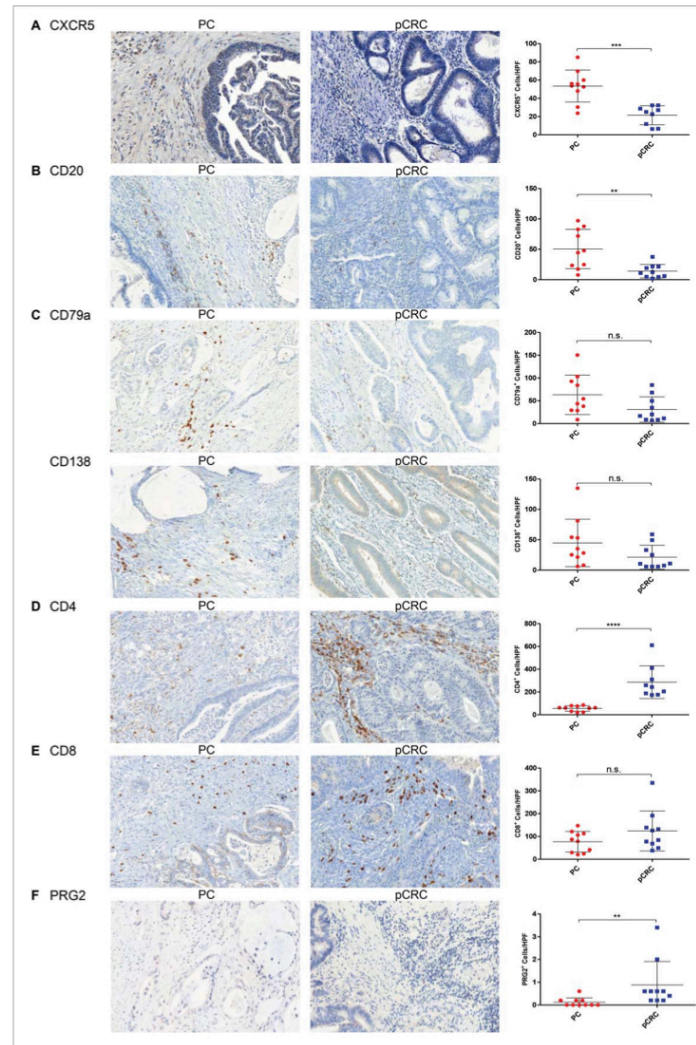
It is known that the pathogenesis and prognosis of pCRC are influenced by the associated immune cell infiltrate,<sup>10,11,13</sup> but this is unclear for PC of colorectal origin. Our current studies were conducted to characterize the immunological tumor microenvironment of PC and its impact on cancer cell proliferation and neovascularisation. With PC associated with short life expectancy, one would suspect highly proliferating cells being a feature of an aggressive tumor. Surprisingly, our results demonstrate the contrary, where cancer cells in PC are senescent and show proliferation arrest compared with pCRC.

Cell proliferation is a biological process to maintain tissue homeostasis. We assessed proliferation activity in PC and CRC by proliferation markers (Ki-67, PCNA and cyclin D1).<sup>20</sup> The Ki-67 antigen is expressed during the late G1, S, G2 and M

phase of the cell cycle, whereas resting cells (G0 phase) lack Ki-67 expression.<sup>21</sup> PCNA is expressed during the DNA synthesis and is a cofactor for the DNA polymerase, which is elevated during the G1/S phase of the cell cycle.<sup>22</sup> Cyclin D1 is a regulatory subunit of cyclin-dependent kinases 4 (CDK4) and CDK6, whose activity is required for cell cycle G1/S transition.<sup>23,24</sup> Each of the proliferation markers demonstrated a significant proliferation arrest in PC compared with CRC, suggesting that the cell cycle is delayed in PC by the action of several control stages. A low number of proliferating cells, as found in PC, suggests growth arrest in cancer cells, probably due to cellular senescence.

Senescent cells are metabolically active, but in growth arrest, usually with a G1 DNA content, and fail to initiate DNA replication. This is caused by the expression of cell-cycle inhibitors, like cyclin-dependent kinase inhibitors p21<sup>Cip1</sup> and p16<sup>INK4a</sup>.<sup>25</sup> A pivotal hallmark of senescence is senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). SAHF regions are enriched in chromatin repression marks like trimethylation of lysine 9 in histone 3 (H3K9me3).<sup>26,27</sup> H3K9me3 plays a key role in cancer immune surveillance by T cells and has been described as responsible for immune evasion and progression in colon carcinoma.<sup>28</sup> CDKN2A codes for the protein p16<sup>INK4a</sup>, which inhibits CDK4 and CDK6 and thereby blocks transition from G1 to S-phase.<sup>29,30</sup> p16<sup>INK4a</sup> also has been shown to have a causative role in SAHF formation.<sup>31</sup> p21<sup>Cip1</sup> mediates the p53-dependent cell cycle G1 phase arrest in response to a variety of stress stimuli by inhibiting the activity of CDK2 or CDK4 complexes.<sup>32</sup> All these senescence markers (H3K9me3, CDKN2A and p21<sup>Cip1</sup>) demonstrated significantly higher SR in PC compared with CRC. Senescent tumor cells have been shown to be subject to enhanced immunosurveillance.<sup>33</sup> In summary, this set of data suggests that PC cells have evolved senescence as tumor escape mechanism leading to evasion from chemotherapeutic treatment.

The tumor microenvironment of PC is characterized by significantly increased numbers of NK cells. NK cells play a crucial role in tumor immunosurveillance, where they control tumor growth, dissemination and recurrence<sup>34</sup> by releasing cytotoxic granzymes, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and the pore-forming protein perforin, inducing programmed cell death.<sup>35</sup> By secreting IFN $\gamma$ , the infiltrating NK cells in PC are highly cytotoxic active and appear simultaneously with high levels of TNF. Braumüller



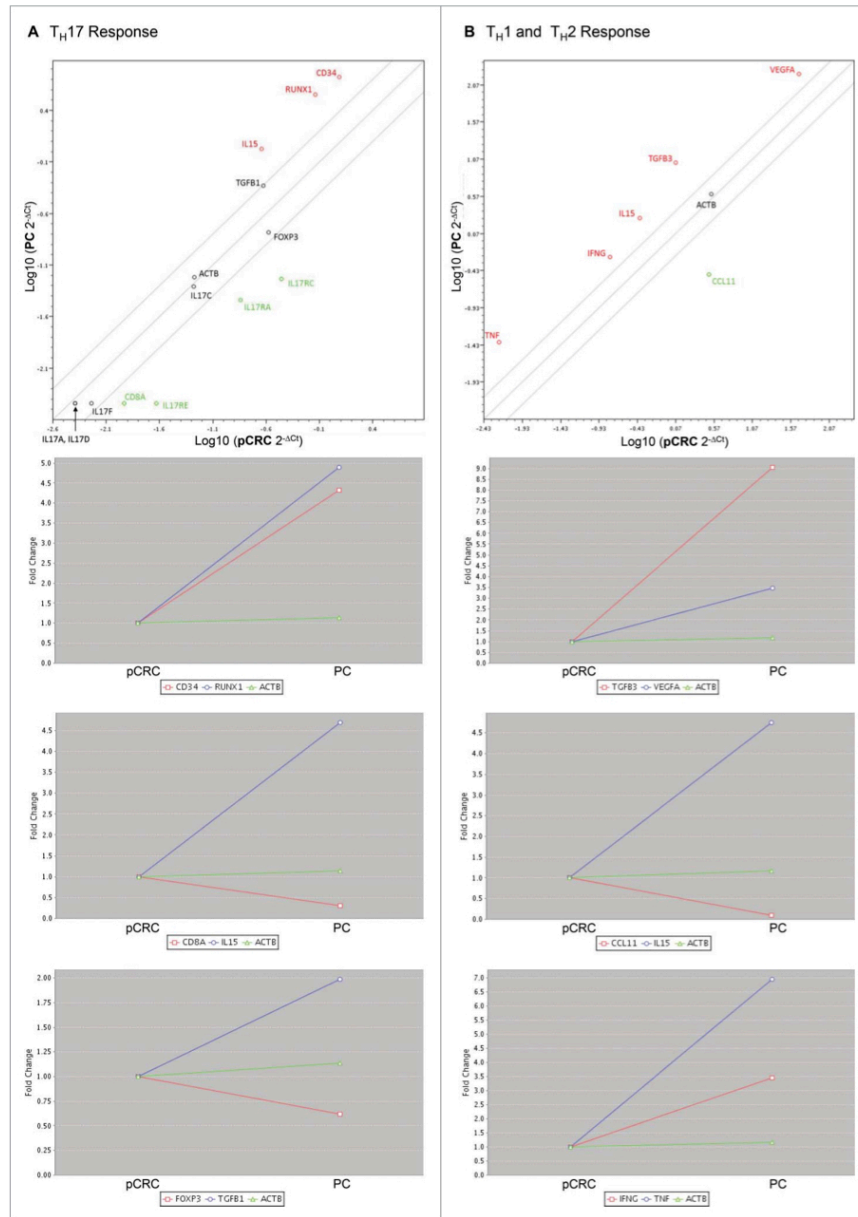
**Figure 2.** Distinct changes in the immune cell infiltrate accompany the metastasis of primary colorectal cancer to peritoneal carcinomatosis. (A) Immunohistochemical staining of PC shows significantly higher levels of CXCR5<sup>+</sup>T<sub>H</sub> cells (n = 10) compared with pCRC (n = 9). (B) Significantly higher numbers of CD20<sup>+</sup>B cells (n = 10) are detected in PC in comparison with pCRC (n = 10). (C) PC demonstrates a tendency to higher levels of CD79a<sup>+</sup> (n = 10) and CD138<sup>+</sup> (n = 10) plasma cells in comparison with pCRC (n = 10). (D) Significantly higher levels of CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub> cells (n = 9) appear in pCRC compared with PC (n = 10). (E) pCRC reveals a tendency to elevated numbers of CD8<sup>+</sup>T<sub>C</sub> cells (n = 10) compared with PC (n = 10). (F) Samples of pCRC show significantly higher numbers of PRG2<sup>+</sup> eosinophilic granulocytes (n = 10) compared with samples of PC (n = 10). Cells were counted in five HPF per patient (20× magnification; Mean and SD are marked in graph; n.s.  $p > 0.05$ ; \* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ); PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; HPF, high-power field.

et al. identified that the combined action of the T<sub>H</sub>1-derived IFN $\gamma$  and TNF directly induces permanent growth arrest in cancer cells.<sup>19</sup> Therefore, NK cell induced senescence is a potential mechanism of immune cell-facilitated tumor surveillance in PC.

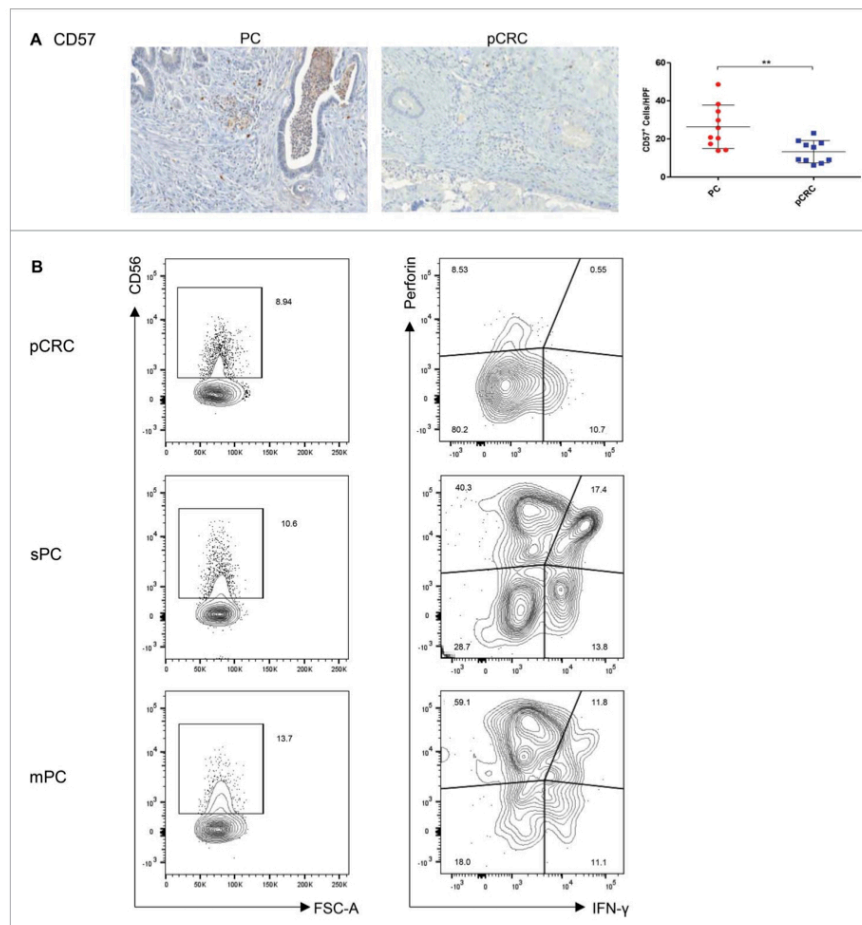
Furthermore, our findings potentially explain why current chemotherapeutic agents used in PC treatment, particularly

targeting rapidly dividing cells, are not as effective as they are in pCRC. We therefore suggest that the Ki-67 index in resected tissues from exploratory laparotomy could serve as proliferation marker to determine which of the advanced tumor patients would likely benefit from cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. In breast cancer, immunohistochemical assessment of Ki-67 has successfully





**Figure 3.** Upregulation of genes encoding for senescence inducing cytokines and neovascularization promoting factors in peritoneal carcinomatosis. (A) PCR array for the human T<sub>H</sub>17 response demonstrates an upregulation of genes encoding for IL-15, TGF-β1, CD34 and RUNX1, a downregulation of genes encoding for CD8A, Foxp3 and IL-17 receptors A, C and E in the group of PC compared with the group of pCRC, as well as the same amount of IL-17A, C, D and F in both groups. (B) PCR array for human T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 response shows an upregulation of genes encoding for IL-15, IFN-γ, TNF, TGF-β3 and VEGF-A in the group of PC compared with the group of pCRC, along with a downregulation of CCL11. Scatter plot and multigroup plot show fold change, which is the normalized (2<sup>-ΔCt</sup>) gene expression in PC divided by the normalized gene expression in pCRC. Upregulation is marked red; downregulation is marked green. Beta-actin (ACTB) functions as housekeeping gene.



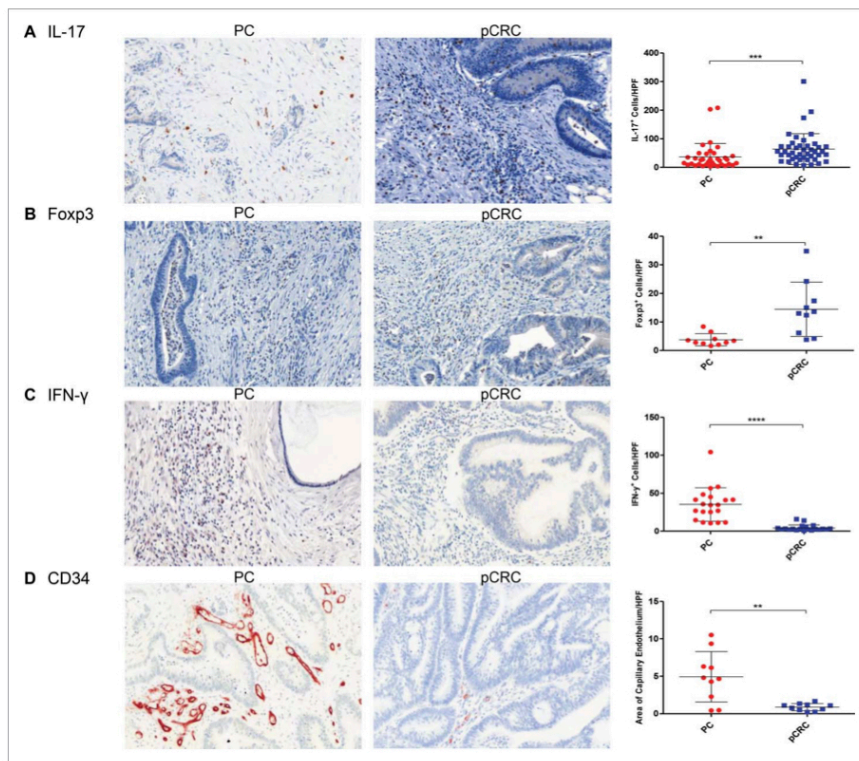
**Figure 4.** Peritoneal carcinomatosis reveals higher levels of cytotoxic active NK cells compared with primary colorectal cancer. (A) Significantly elevated numbers of CD57<sup>+</sup>NK cells ( $n = 10$ ) were detected by immunohistochemistry in samples of PC in comparison with samples of pCRC ( $n = 10$ ). Cells were counted in five HPF per patient (20 $\times$  magnification; Mean and SD are marked in graph; \*\* $p \leq 0.01$ ); PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; HPF, high-power field. (B) Flow cytometry analyses of CD56<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> Perforin<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> cells reveal higher expressions in synchronous and metachronous PC compared with pCRC. Dotplots show T cells pre-gated on CD45<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells.

been used for the prognosis and prediction of chemotherapeutic responsiveness.<sup>36</sup>

We also investigated how the immune cell infiltrate changes during the progression from pCRC to PC. Bindea et al. emphasize that immune reactions evolve with tumor progression.<sup>37</sup> T cell subpopulations are highly expressed at early CRC stages. In contrast, the density of B, T<sub>FH</sub> and antigen-presenting cells increases with late tumor stages. With PC being defined as UICC stage IV of CRC it shows high levels of T<sub>FH</sub>, B and plasma cells, but significantly fewer CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub> and CD8<sup>+</sup>T<sub>C</sub> cells compared with pCRC, consistent with the study of Bindea et al. T<sub>FH</sub> cells support the differentiation of antigen-specific B cells into memory and plasma cells. Increased T<sub>FH</sub> cell activity is

involved in lymphoma development.<sup>38</sup> B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis.<sup>39</sup>

Looking at immune responses facilitating metastasis, IL-17<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17 cells and Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> cells are significantly higher in pCRC. T<sub>H</sub>17 cell recruitment to the primary tumor site inhibits antitumor immunity and enhances metastasis.<sup>18,40</sup> Supporting this theory, IL-17 deficiency prevents metastasis in colon cancer models.<sup>41</sup> T<sub>reg</sub> cells suppress NK and CD8<sup>+</sup>T<sub>C</sub> cells, increasing tumor growth, invasion and migration from the primary tumor site.<sup>42</sup> Additional studies are needed to investigate the impact of intestinal permeability and bacterial translocation on peritoneal metastasis, considering this is known in colorectal cancer and late stages of liver disease.<sup>43,44</sup>



**Figure 5.** Composition of the tumor microenvironment changes during metastasis from primary colorectal cancer to peritoneal carcinomatosis. (A) Immunohistochemical staining shows significantly higher numbers of IL-17A<sup>+</sup>T<sub>H</sub>17 cells in pCRC (n = 43) compared with PC (n = 36). (B) Significantly higher levels of Foxp3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> cells (n = 10) were found in pCRC compared with PC (n = 10). (C) Significantly elevated numbers of IFN-γ<sup>+</sup> cells (n = 20) were detected in PC in comparison with pCRC (n = 20). (D) Significantly more capillary endothelium was found in samples of PC (n = 10) compared with samples of pCRC (n = 10). Cells were counted and area of capillary endothelium was measured in five HPF per patient (20× magnification; Mean and SD are marked in graph; \*\**p* ≤ 0.01; \*\*\**p* ≤ 0.001; \*\*\*\**p* ≤ 0.0001); PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; HPF, high-power field.

Primary tumors effect distant sites to become pre-metastatic niches by producing systemic factors like VEGF-A, TGF-β and TNF.<sup>45</sup> PC being rich in VEGF-A, TGF-β and TNF indicates a successful pre-metastatic niche development that has progressed to metastatic formation. This is mediated by the lack of T<sub>H</sub>1 cells in PC, supporting epithelial tumor seeding,<sup>46</sup> the abundance of TNF, promoting tumor growth in experimental models of colitis-associated cancer,<sup>47</sup> and by TGF-β, facilitating tumor growth, invasion and metastasis in advanced stages of CRC.<sup>48</sup> All of these factors, and the mentioned high levels of B and T<sub>HH</sub> cells, support neovascularization.

Tumor angiogenesis is mediated by several key angiogenic mediators, such as VEGF-A, and is crucial for the growth and dissemination of tumor cells. VEGF-A is induced by hypoxia and is a target of the TGF-β signaling pathway.<sup>49</sup> Consistent with this mechanism our results show significantly more neovascularization in the PC microenvironment. Additionally, a negative correlation between CD34 enrichment and high SR was observed. This is congruent with a study of Foersch et al., demonstrating, that the lack of VEGFR2 signaling in colorectal cancer cells is accompanied by an upregulation of various markers for cellular senescence.<sup>50</sup>

**Table 3.** Significantly more angiogenesis in PC compared with pCRC.

Angiogenesis	PC (Sq Inch/HPF)			pCRC (Sq Inch/HPF)			<i>p</i>
	Mean ± SD	95% CI	n	Mean ± SD	95% CI	n	
CD34	4.9 ± 3.4	2.5–7.3	10	0.9 ± 0.5	0.5–1.5	10	0.0089

**Abbreviations:** PC, peritoneal carcinomatosis; pCRC, primary colorectal cancer; Sq Inch, area of capillary endothelium in square inches; HPF, high-power field; SD, standard deviation; CI, confidence interval.



Therefore, VEGF-A antibodies are a promising approach to treat PC patients. Monoclonal antibodies against VEGF- (Bevacizumab) and EGF-receptors (Cetuximab) are currently being used in metastatic CRC, depending on molecular markers (KRAS and BRAF mutations),<sup>51</sup> and have already shown a

characteristic staining of the whole slide. Negative and positive stained tumor cells were counted via ImageJ (National Institutes of Health, USA) cell counter function. For determination of the PR, we analyzed the proliferation markers Ki-67, PCNA and cyclin D1. The PR is defined as:

$$PR = \frac{\text{number of proliferating cancer cells}}{\text{number of proliferating cancer cells} + \text{number of non - proliferating cancer cells}}$$

benefit in long-term survival.<sup>52,53</sup> Further studies are needed to determine, if blocking angiogenic mediators could improve long-term survival, especially for the subgroup of PC patients, who show an extended level of neovascularization.

For determination of the SR, we analyzed the senescence markers H3K9me3, p21<sup>Cip1</sup> and CDKN2A. The SR is defined as:

$$SR = \frac{\text{number of senescent cancer cells}}{\text{number of senescent cancer cells} + \text{number of non - senescent cancer cells}}.$$

In summary (Illustration 1), our studies reveal that metastasis of primary CRC to PC is accompanied by changes in the immune cell infiltrate inducing senescence. Angiogenesis-related factors promote extensive neovascularization. The balance between anti- and pro-tumor effects influences cancer cell division rates.

## Methods

### Patients

FFPE samples of patients (n = 38) who had tumor surgery on PC of colorectal origin between 2004 and 2008 were analyzed. The control group consisted of patients (n = 45) who had tumor surgery between 2004 and 2011 on pCRC without a diagnosed metastasis. FACS analysis was performed with samples of patients (n = 8) treated with tumor surgery in 2014. The study was conducted at the Department of Surgery, University Medical Center Regensburg, Germany, according to the principles of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee (No. 14-101-0014).

### Immunohistochemistry

FFPE samples were stained with anti-human antibodies for CXCR5 (Sigma-Aldrich, HPA042432), IFN $\gamma$  (Abcam, ab25101), PRG2 (Sigma-Aldrich, HPA038515), Ki-67 (Abcam, ab16667), H3K9me3 (Cell Signaling, #9733S), PCNA (Cell Signaling, #13110), p21<sup>Cip1</sup> (Cell Signaling, #2947), cyclin D1 (Cell Signaling, #2978), CDKN2A (Abcam, ab54210), CD34 (Ventana, 790-2927), Foxp3 (eBioscience, 14-4776) and IL-17 (R&D Systems, AF-317-NA). Immunohistochemical staining for CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD57, CD20, CD79a and CD138 were provided by the Department of Pathology, University Medical Center Regensburg. For quantifying positive cell staining five high-power fields (HPFs; 20 $\times$  magnification) were counted per slide by two independent examiners.

To define proliferation and SR each tumor slide was manually scanned with a microscope at 20 $\times$  magnification. We captured five areas per slide (five HPFs) with each showing a

### RNA isolation and PCR array

RNA was extracted from FFPE samples using the RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany), as described by the manufacturer. A pool of 10 PC samples was compared with a pool of 10 pCRC samples. Expression of genes relevant for T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 cell responses were determined with RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays (Qiagen) using RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) and the LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

### Flow cytometry

Single cell suspensions of tumors were stained with anti-human antibodies specific for CD45 (BD, 560777), CD3 (Miltenyi Biotec, 130-094-363), CD4 (Miltenyi Biotec, 130-094-153 and 130-094-963), CD8 (Miltenyi Biotec, 130-096-561), CD56 (Beckman Coulter, IM2474), CD107a (Miltenyi Biotec, 130-095-520), IFN $\gamma$  (eBioscience, 11-7319-82), Foxp3 (eBioscience, 25-1178-42) and perforin (eBioscience, 25-9994-42). Analyses were performed using a FACSCanto II flow cytometer (BD).

### Statistical analysis

Normal distributed data was evaluated by standard two-tailed Student's *t*-tests. Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used for data not showing a normal distribution. Pearson's correlation, with bivariate analysis, was used for correlation analysis. Statistics were evaluated with SPSS Statistics software (SPSS GmbH Software, Munich, Germany). Graph Pad Prism was used to calculate standard deviation (SD) and 95% confidence interval (CI) of experimental data sets. *p*-values  $\leq 0.05$  are considered marginally significant and labeled with an asterisk (\*).

For further information regarding methods see Supporting Material.

### Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

Tatjana Schifferstein, Marcus Kielmanowicz and Manuela Kovács-Sautter provided skillful technical support. We thank all members of the laboratory of Chronic Immunopathology for critical and helpful discussions.

## Funding

This project was supported by grant Fi1526/4-1 and Fi1526/5-1 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by the Regensburg Center of Interventional Immunology with salaries for laboratory assistance and analysis. The authors gratefully acknowledge this support.

## Author contributions

C.T.S., S.B., R.K., S.F.F. planned, performed and analyzed the experiments, C.T.S., S.B., R.K., S.F.F. interpreted the experiments, C.T.S., R.K., S.F.F. wrote the manuscript, S.B., P.R. contributed to the experimental design, G. G., P.P. supervised the surgical sampling, E.K.G., H.J.S. made helpful suggestions.

## ORCID

Gabriel Glockzin  <http://orcid.org/0000-0002-7069-2466>

## References

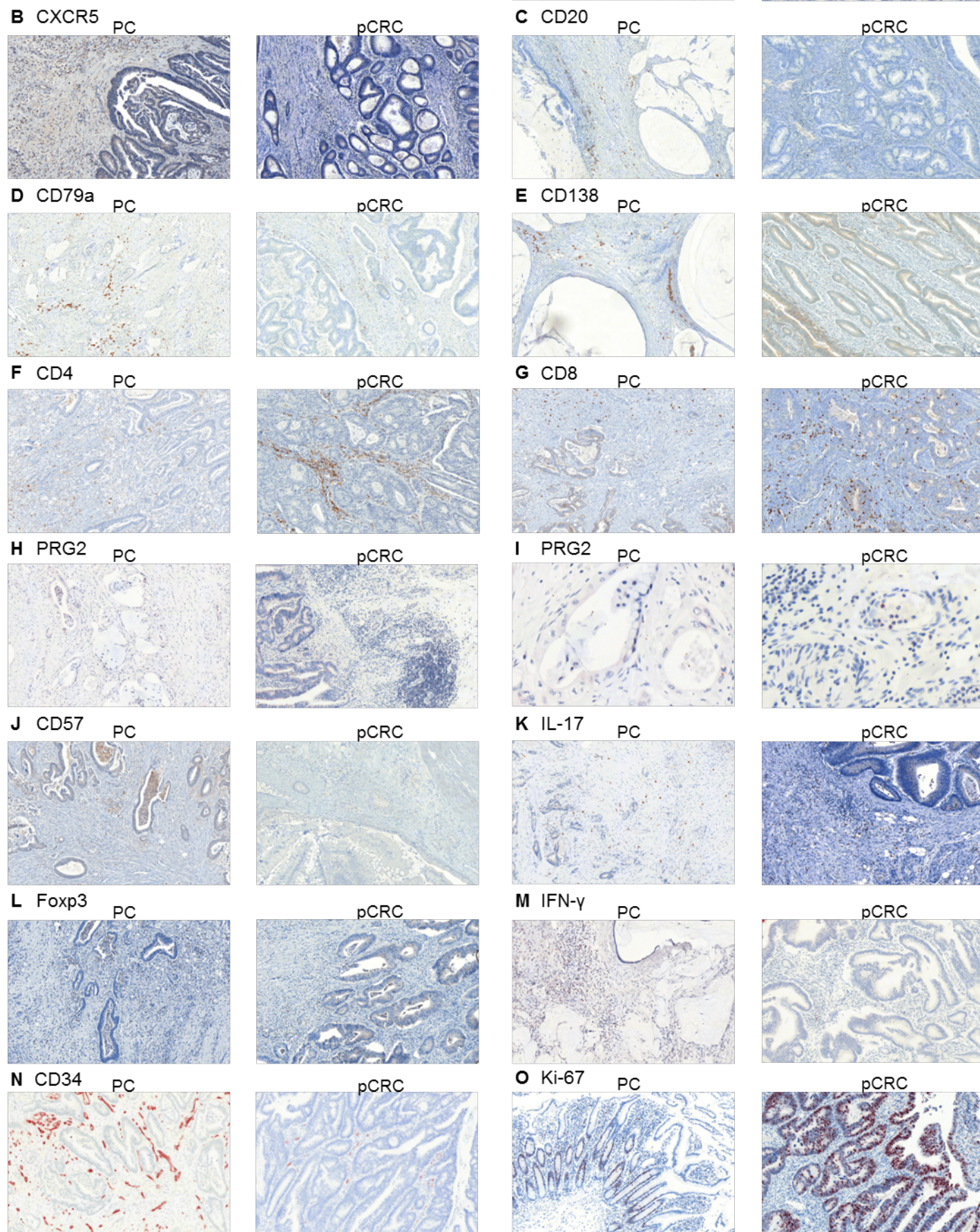
- Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A. Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* 2012; 99:699-705; PMID:22287157; <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.8679>
- Kuijpers AM, Mirck B, Aalbers AG, Nienhuijs SW, de Hingh IH, Wiersema MJ, van Ramshorst B, van Ginkel RJ, Havenga K, Bremers AJ et al. Cytoreduction and HIPEC in the Netherlands: nationwide long-term outcome following the Dutch protocol. *Ann Surg Oncol* 2013; 20:4224-30; PMID:23897008; <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-013-3145-9>
- Zani S, Papalezova K, Stinnett S, Tyler D, Hsu D, Blazer DG, 3rd. Modest advances in survival for patients with colorectal-associated peritoneal carcinomatosis in the era of modern chemotherapy. *J Surg Oncol* 2013; 107:307-11; PMID:22811275; <http://dx.doi.org/10.1002/jso.23222>
- Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Takabe K. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20:12493-500; PMID:25253949; <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i35.12493>
- Sugarbaker PH. Peritoneum as the first-line of defense in carcinomatosis. *J Surg Oncol* 2007; 95:93-6; PMID:17262739; <http://dx.doi.org/10.1002/jso.20676>
- Ceelen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol* 2009; 10:72-9; PMID:19111247; [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70335-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70335-8)
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74; PMID:21376230; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Strober W. Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract. *Trends Immunol* 2015; 36:451-9; PMID:26194796; <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.06.007>
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7; PMID:12490959; <http://dx.doi.org/10.1038/nature01322>
- Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138:2101-14 e5; PMID:20420949; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:298-306; PMID:22419253; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3245>
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960-4; PMID:17008531; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129139>
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pages F et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; 71:1263-71; PMID:21303976; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>
- Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, Ezumi K, Kato H, Kawasaki T, Furukawa H et al. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004; 207:109-15; PMID:15050740; <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2003.10.032>
- Jauch D, Martin M, Schiechl G, Kesselring R, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S. Interleukin 21 controls tumour growth and tumour immunosurveillance in colitis-associated tumorigenesis in mice. *Gut* 2011; 60:1678-86; PMID:21948944; <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300612>
- Martin M, Kesselring RK, Saidou B, Brunner SM, Schiechl G, Mouris VF, Wege AK, Rümmele P, Schlitt HJ, Geissler EK et al. RORgammat hematopoietic cells are necessary for tumor cell proliferation during colitis-associated tumorigenesis in mice. *Eur J Immunol* 2015; 45:1667-79.
- Pastille E, Bardini K, Fleissner D, Adamczyk A, Frede A, Wadwa M, von Smolinski D, Kasper S, Sparwasser T, Gruber AD et al. Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res* 2014; 74:4258-69; PMID:24906621; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3065>
- Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:73-86; PMID:25614318; <http://dx.doi.org/10.1038/nri3789>
- Braumüller H, Wieder T, Brenner E, Aßmann S, Hahn M, Alkhaled M, Schilbach K, Essmann F, Kneilling M, Griessinger C et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 2013; 494:361-5; PMID:23376950; <http://dx.doi.org/10.1038/nature11824>
- Jurikova M, Danilov L, Polak S, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta histochemica* 2016; 118:544-52; PMID:27246286; <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sanchez-Acuna G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 2013; 18:e174-9; PMID:23229269; <http://dx.doi.org/10.4317/medoral.18573>
- Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemona A, Czyżewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29:3049-52; PMID:19661314
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; 7:812-21; PMID:8491378; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.7.5.812>
- Dai Y, Wilson G, Huang B, Peng M, Teng G, Zhang D, Zhang R, Ebert MP, Chen J, Wong BC et al. Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5:e1170; PMID:24722295; <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.137>
- Campisi J, d'Adda di Fagnola F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:729-40; PMID:17667954; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2233>
- Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res* 2012; 111:97-109; PMID:22723221; <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247866>
- Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 2012; 13:343-57; PMID:22473383; <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3173>
- Paschall AV, Yang D, Lu C, Choi JH, Li X, Liu F, Figueroa M, Oberlies NH, Pearce C, Bollag WB et al. H3K9 trimethylation silences fas expression to confer colon carcinoma immune escape and 5-fluorouracil chemoresistance. *J Immunol* 2015; 195:1868-82; PMID:26136424; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1402243>



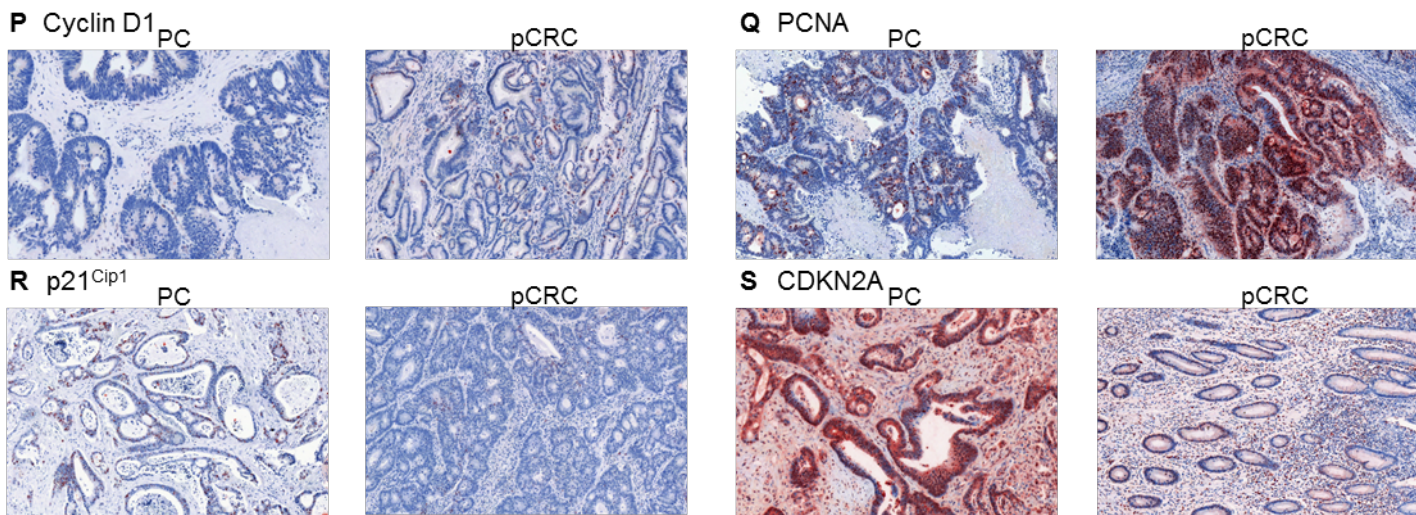
29. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1291-7; PMID:17028578; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1491>
30. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 2011; 10:2497-503; PMID:21775818; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.15.16776>
31. Di Micco R, Sulli G, Dobrev M, Lontos M, Botrugno OA, Gargiulo G, dal Zuffo R, Matti V, d'Ario G, Montani E et al. Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nat Cell Biol* 2011; 13:292-302; PMID:21336312; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2170>
32. Garte AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 2005; 65:3980-5; PMID:15899785; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3995>
33. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 2011; 479:547-51; PMID:22080947; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10599>
34. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, Taieb J. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014; 20:3738-50; PMID:24833840; <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.3738>
35. Vacca P, Martini S, Garelli V, Passalacqua G, Moretta L, Mingari MC. NK cells from malignant pleural effusions are not anergic but produce cytokines and display strong antitumor activity on short-term IL-2 activation. *Eur J Immunol* 2013; 43:550-61; PMID:23192659; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201242783>
36. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:1656-64; PMID:21960707; <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djr393>
37. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 2013; 39:782-95; PMID:24138885; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003>
38. Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:412-26; PMID:23681096; <http://dx.doi.org/10.1038/nri3447>
39. Yang C, Lee H, Pal S, Jove V, Deng J, Zhang W, Hoon DS, Wakabayashi M, Forman S, Yu H. B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis. *PloS one* 2013; 8:e64159; PMID:23734190; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064159>
40. Kesselring R, Jauch D, Fichtner-Feigl S. Interleukin 21 impairs tumor immunosurveillance of colitis-associated colorectal cancer. *Oncol Immunology* 2012; 1:537-8; PMID:22754778; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.19407>
41. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:248-56; PMID:20336152; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2742>
42. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyriakoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 2006; 176:1582-7; PMID:16424187; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1582>
43. Kesselring R, Glaesner J, Hiergeist A, Naschberger E, Neumann H, Brunner SM, Wege AK, Seebauer C, Köhl G, Merkl S et al. IRAK-M expression in tumor cells supports colorectal cancer progression through reduction of antimicrobial defense and stabilization of STAT3. *Cancer Cell* 2016; 29:684-96; PMID:27150039; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2016.03.014>
44. Wang L, Llorente C, Hartmann P, Yang AM, Chen P, Schnabl B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods* 2015; 421:44-53; PMID:25595554; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015>
45. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; 16:717-27; PMID:25082194; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3015>
46. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ et al. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107-11; PMID:11323675; <http://dx.doi.org/10.1038/35074122>
47. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 2008; 118:560-70; PMID:18219394; <http://dx.doi.org/10.1172/jci32453>
48. Padua D, Massague J. Roles of TGF-beta in metastasis. *Cell Res* 2009; 19:89-102; PMID:19050696; <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2008.316>
49. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276:38527-35; PMID:11486006; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M104536200>
50. Foersch S, Sperka T, Lindner C, Taut A, Rudolph KL, Breier G et al. VEGFR2 Signaling Prevents Colorectal Cancer Cell Senescence to Promote Tumorigenesis in Mice With Colitis. *Gastroenterology* 2015; 149:177-89 e10; PMID:25797700; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.016>
51. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29:2011-9; PMID:21502544; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>
52. Feng QY, Wei Y, Chen JW, Chang WJ, Ye LC, Zhu DX et al. Anti-EGFR and anti-VEGF agents: Important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2014; 20:4263-75; PMID:24764664; <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4263>
53. Khattak MA, Martin H, Davidson A, Phillips M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Colorectal Cancer* 2015; 14:81-90; PMID:25666296; <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2014.12.011>



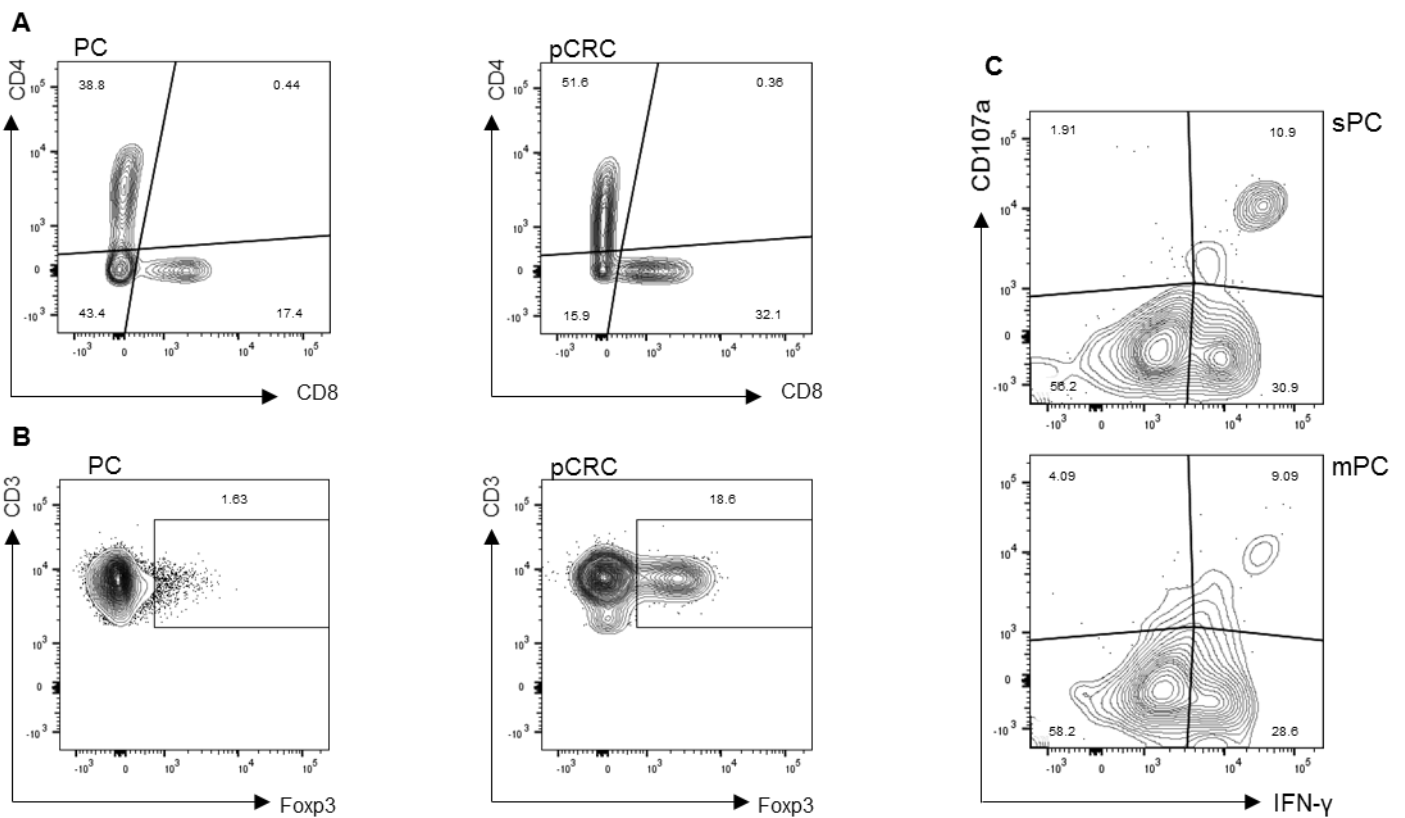
## 2.2 Supporting Figures





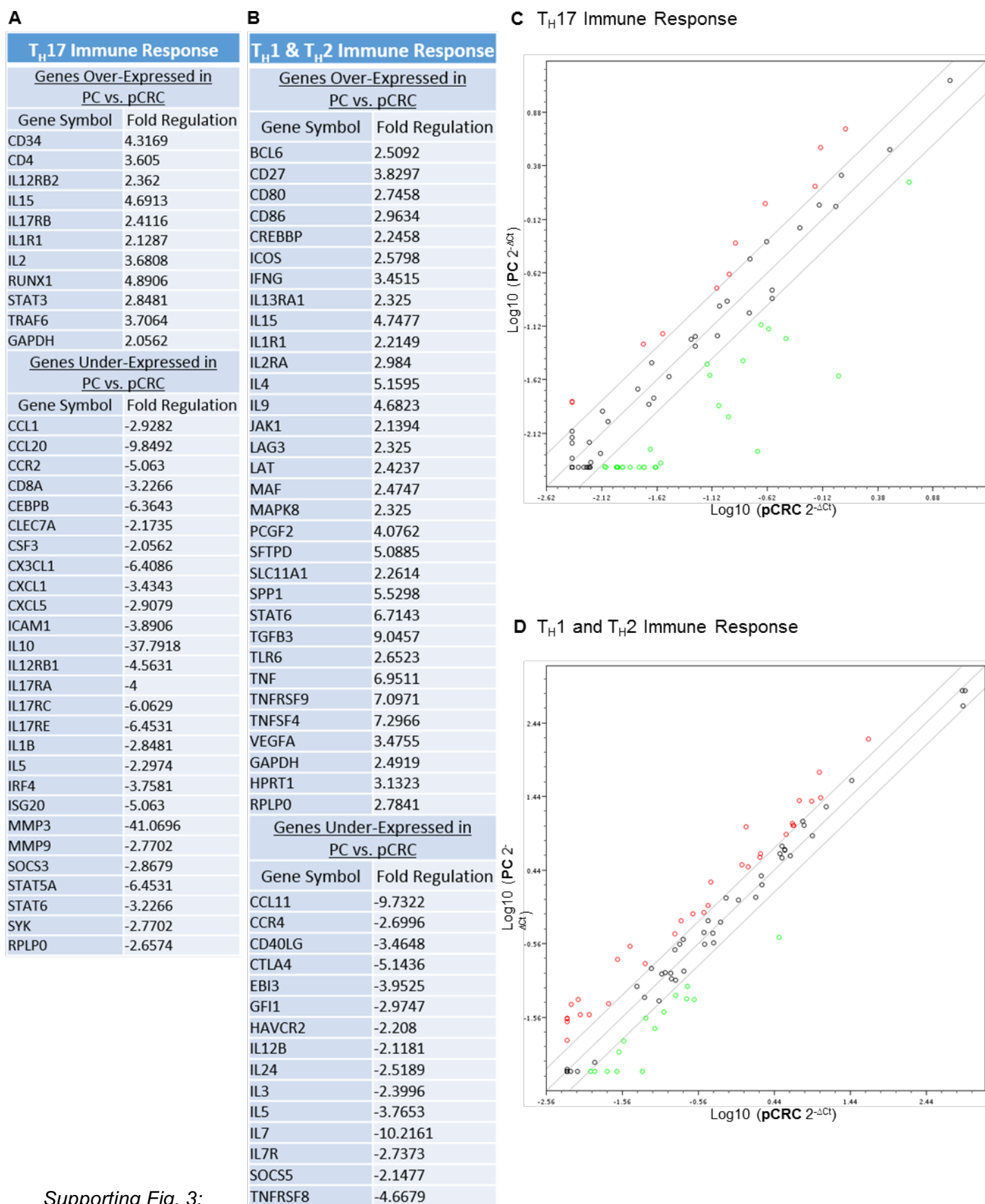


Supporting Fig. 1: Immunohistochemical staining of PC and pCRC samples  
(A – H, J – S) 10x magnification  
(I) 40x magnification



Supporting Fig. 2: Flow cytometry analyses of PC and pCRC samples  
(A) Enhanced expression of CD4+ and CD8+ cells in pCRC compared with in PC.  
(B) Higher expression of Foxp3+ cells in pCRC compared with PC.  
(C) Enhanced expression of CD107a+CD56+ cells in PC.  
Dotplots show T cells pregated on CD45+ and CD3+ cells.





Supporting Fig. 3:

(A) Summary of PCR array results for TH17 immune response.

(B) Summary of PCR array results for TH1 and TH2 immune response.

(C) Scatter plot of normalized gene expression of TH17 immune response.

(D) Scatter plot of normalized gene expression of TH1 and TH2 immune response.

Fold-Regulation is the normalized gene expression in PC divided the normalized gene expression in pCRC represented in a biologically meaningful way. Values greater than two indicate a positive- or an up-regulation (marked red), values less than minus two indicate a negative or down-regulation (marked green)

## Literaturverzeichnis

1. Segelman, J. *et al.* Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg* **99**, 699–705 (2012).
2. Siewert, J. R., Rothmund, M. & Schumpelick, V. Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie. *Onkol. Chir.* 1 online resource (Online-Ressource.) (2010).
3. Sugarbaker, P. H. Peritoneum as the first-line of defense in carcinomatosis. *J Surg Oncol* **95**, 93–96 (2007).
4. Ceelen, W. P. & Bracke, M. E. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol* **10**, 72–79 (2009).
5. Cunliffe, W. J. & Sugarbaker, P. H. Gastrointestinal malignancy: rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surg* **76**, 1082–1090 (1989).
6. Spratt, J. S., Adcock, R. A., Muskovin, M., Sherrill, W. & McKeown, J. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res* **40**, 256–260 (1980).
7. Sugarbaker, P. H. Peritonectomy procedures. *Ann Surg* **221**, 29–42 (1995).
8. Confuorto, G., Giuliano, M. E., Grimaldi, A. & Viviano, C. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: HIPEC? *Surg. Oncol.* **16**, 149–152 (2007).
9. Cao, C., Yan, T. D., Black, D. & Morris, D. L. A systematic review and meta-analysis of cytoreductive surgery with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Ann Surg Oncol* **16**, 2152–2165 (2009).
10. Elias, D. *et al.* Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study. *J Clin Oncol* **28**, 63–68 (2010).
11. Glehen, O. *et al.* Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis

- from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol* **22**, 3284–3292 (2004).
12. Kuijpers, A. M. *et al.* Cytoreduction and HIPEC in the Netherlands: nationwide long-term outcome following the Dutch protocol. *Ann Surg Oncol* **20**, 4224–4230 (2013).
  13. Pestieau, S. R. & Sugarbaker, P. H. Treatment of primary colon cancer with peritoneal carcinomatosis: comparison of concomitant vs. delayed management. *Dis Colon Rectum* **43**, 1341–1348 (2000).
  14. Verwaal, V. J. *et al.* Long-term survival of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Ann Surg Oncol* **12**, 65–71 (2005).
  15. Verwaal, V. J. *et al.* Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* **21**, 3737–3743 (2003).
  16. Zani, S. *et al.* Modest advances in survival for patients with colorectal-associated peritoneal carcinomatosis in the era of modern chemotherapy. *J Surg Oncol* **107**, 307–311 (2013).
  17. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  18. Fichtner-Feigl, S., Kesselring, R. & Strober, W. Chronic inflammation and the development of malignancy in the GI tract. *Trends Immunol* (2015). doi:10.1016/j.it.2015.06.007
  19. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
  20. Kaler, P., Godasi, B. N., Augenlicht, L. & Klampfer, L. The NF-kappaB/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1beta. *Cancer Microenviron* (2009). doi:10.1007/s12307-009-0030-y
  21. Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E. & Karin, M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2101–2114 e5 (2010).

22. Waldner, M., Schimanski, C. C. & Neurath, M. F. Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J Gastroenterol* **12**, 7233–7238 (2006).
23. Atreya, I. & Neurath, M. F. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**, 561–572 (2008).
24. Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298–306 (2012).
25. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* (80-. ). **313**, 1960–1964 (2006).
26. Galon, J., Fridman, W. H. & Pages, F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res* **67**, 1883–1886 (2007).
27. Pages, F. *et al.* In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* **27**, 5944–5951 (2009).
28. Tosolini, M. *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* **71**, 1263–1271 (2011).
29. Peddareddigari, V. G., Wang, D. & Dubois, R. N. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron* **3**, 149–166 (2010).
30. Ishida, H. *et al.* Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett* **207**, 109–115 (2004).
31. Verwaal, V. J., Bruin, S., Boot, H., van Slooten, G. & van Tinteren, H. 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* **15**, 2426–2432 (2008).
32. Jauch, D. *et al.* Interleukin 21 controls tumour growth and tumour immunosurveillance in colitis-associated tumorigenesis in mice. *Gut* **60**, 1678–

- 1686 (2011).
33. Liu, Z. *et al.* Presence of FOXP3(+)Treg cells is correlated with colorectal cancer progression. *Int J Clin Exp Med* **7**, 1781–1785 (2014).
  34. Pastille, E. *et al.* Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res* **74**, 4258–4269 (2014).
  35. Kitamura, T., Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* **15**, 73–86 (2015).
  36. Martin, M. *et al.* RORgammat hematopoietic cells are necessary for tumor cell proliferation during colitis-associated tumorigenesis in mice. *Eur J Immunol* (2015). doi:10.1002/eji.201444915
  37. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–365 (2013).
  38. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–1081 (2009).
  39. Aoyagi, T., Terracina, K. P., Raza, A. & Takabe, K. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol* **20**, 12493–12500 (2014).
  40. Jurikova, M., Danihel, L., Polak, S. & Varga, I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem* **118**, 544–552 (2016).
  41. Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A. D. & Sanchez-Acuna, G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **18**, e174-9 (2013).
  42. Guzinska-Ustymowicz, K., Pryczynicz, A., Kemon, A. & Czyzewska, J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* **29**, 3049–3052 (2009).

43. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* **7**, 812–821 (1993).
44. Dai, Y. *et al.* Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis* **5**, e1170 (2014).
45. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729–740 (2007).
46. Bernardes de Jesus, B. & Blasco, M. A. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res* **111**, 97–109 (2012).
47. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* **13**, 343–357 (2012).
48. Paschall, A. V *et al.* H3K9 Trimethylation Silences Fas Expression To Confer Colon Carcinoma Immune Escape and 5-Fluorouracil Chemoresistance. *J Immunol* **195**, 1868–1882 (2015).
49. Takahashi, A. *et al.* Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* **8**, 1291–1297 (2006).
50. Witkiewicz, A. K., Knudsen, K. E., Dicker, A. P. & Knudsen, E. S. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* **10**, 2497–2503 (2011).
51. Di Micco, R. *et al.* Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nat Cell Biol* **13**, 292–302 (2011).
52. Gartel, A. L. & Radhakrishnan, S. K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**, 3980–3985 (2005).
53. Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551 (2011).
54. Malmberg, K. J. *et al.* NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **57**,

- 1541–1552 (2008).
55. Pernot, S. *et al.* Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World J Gastroenterol* **20**, 3738–3750 (2014).
  56. Kadri, N. *et al.* Dynamic Regulation of NK Cell Responsiveness. *Curr Top Microbiol Immunol* **395**, 95–114 (2016).
  57. Vacca, P. *et al.* NK cells from malignant pleural effusions are not anergic but produce cytokines and display strong antitumor activity on short-term IL-2 activation. *Eur J Immunol* **43**, 550–561 (2013).
  58. Coca, S. *et al.* The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **79**, 2320–2328 (1997).
  59. Dowsett, M. *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* **103**, 1656–1664 (2011).
  60. Bindea, G. *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* **39**, 782–795 (2013).
  61. Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R. & Deenick, E. K. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* **13**, 412–426 (2013).
  62. Yang, C. *et al.* B cells promote tumor progression via STAT3 regulated-angiogenesis. *PLoS One* **8**, e64159 (2013).
  63. Kesselring, R., Jauch, D. & Fichtner-Feigl, S. Interleukin 21 impairs tumor immunosurveillance of colitis-associated colorectal cancer. *Oncoimmunology* **1**, 537–538 (2012).
  64. Zou, W. & Restifo, N. P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **10**, 248–256 (2010).
  65. Smyth, M. J. *et al.* CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* **176**, 1582–1587 (2006).
  66. Kesselring, R. *et al.* IRAK-M Expression in Tumor Cells Supports Colorectal Cancer Progression through Reduction of Antimicrobial Defense and

- Stabilization of STAT3. *Cancer Cell* **29**, 684–696 (2016).
67. McAllister, S. S. & Weinberg, R. A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* **16**, 717–727 (2014).
  68. Camus, M. *et al.* Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res* **69**, 2685–2693 (2009).
  69. Shankaran, V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
  70. Kraus, S. & Arber, N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 405–410 (2009).
  71. Popivanova, B. K. *et al.* Blocking TNF- $\alpha$  in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* **118**, 560–570 (2008).
  72. Biswas, S. *et al.* Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer. *Cancer Res* **64**, 4687–4692 (2004).
  73. Blobel, G. C., Schiemann, W. P. & Lodish, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* **342**, 1350–1358 (2000).
  74. Padua, D. & Massague, J. Roles of TGF $\beta$  in metastasis. *Cell Res* **19**, 89–102 (2009).
  75. Sanchez-Elsner, T. *et al.* Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* **276**, 38527–38535 (2001).
  76. Shaheen, R. M. *et al.* Inhibited growth of colon cancer carcinomas by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br J Cancer* **85**, 584–589 (2001).
  77. Maurel, J. & Postigo, A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice. *Curr Cancer Drug Targets* **15**, 703–715 (2015).



78. Van Cutsem, E. *et al.* Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* **29**, 2011–2019 (2011).
79. Feng, Q. Y. *et al.* Anti-EGFR and anti-VEGF agents: Important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* **20**, 4263–4275 (2014).
80. Khattak, M. A., Martin, H., Davidson, A. & Phillips, M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Color. Cancer* **14**, 81–90 (2015).
81. Van Cutsem, E. *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **360**, 1408–1417 (2009).
82. Foersch, S. *et al.* VEGFR2 Signaling Prevents Colorectal Cancer Cell Senescence to Promote Tumorigenesis in Mice With Colitis. *Gastroenterology* **149**, 177–189 e10 (2015).

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl für den immerwährenden Glauben an meine Fähigkeiten und die Motivation während der gesamten experimentellen Arbeit. Danke für die herausragende Betreuung, die mir geschaffenen Möglichkeiten und die daraus resultierenden Erfolge. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt für die Fortführung der Betreuung der Doktorarbeit und den wissenschaftlichen Input bei Erstellung des Manuskripts.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Rebecca Kesselring, die sich immer für mich engagiert und mich gefördert hat. Die einzigartige Betreuung, immer Zeit für Fragen und andauernde Unterstützung, über die Doktorarbeit hinaus, haben die Zeit im Fi-Fei Labor zu etwas ganz Besonderem gemacht, wofür ich immer dankbar sein werde.

Deshalb gilt auch besonderer Dank dem ganzen Team des Labors für chronische Immunpathologie, insbesondere PD Dr. Stefan Brunner, Manuela Kovács-Sautter, Tatjana Schifferstein, Marcus Kielmanowicz, Marlene Rosendahl und meinem Doktorarbeits-Kollegen Christoph Rubner. Danke an das unglaublich tolle Team für die Unterstützung, Hilfe und eure Herzlichkeit!

Besten Dank an Prof. Dr. Edward Geissler für die Korrekturen des Manuskripts und für die Schaffung der exzellenten Rahmenbedingungen in der experimentellen Chirurgie.

Besonderer Dank gilt Dr. Bernd Schnabl für die herzliche Aufnahme in seinem Labor an der University of California, San Diego, School of Medicine, California, USA. Die Erfahrung in einem so exzellenten Umfeld Wissenschaft zu betreiben wird mich immer begleiten.

Tiefster Dank an meine Familie und Freunde. Danke, dass ihr mich immer unterstützt. Ohne eure Liebe wäre Vieles nicht möglich. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Oma Theresia Seebauer bedanken; du bist mein Vorbild.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Caroline Theresa Seebauer  
Geburtsdatum: 26.07.1989  
Geburtsort: München  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Beruflicher Werdegang

---

Seit 07/2016 Assistenzärztin  
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde  
Prof. Dr. Strutz  
Universitätsklinikum Regensburg

07/2016 Approbation als Ärztin

### Schulischer und universitärer Werdegang

---

06/2016 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/2015 – 04/2016 Praktisches Jahr

10/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2009 - 2016 Studium der Humanmedizin  
an der Universität Regensburg

2000 - 2009 Franz-Marc-Gymnasium Markt Schwaben  
Abschluss: Abitur

1996 - 2000 Grundschule Ottenhofen

### Wissenschaftliche Arbeit

---

11/2014 - 05/2015 Forschungsaufenthalt an der University of California  
San Diego, USA  
Forschungsgruppe Dr. med. Schnabl, Associate  
Professor Division of Gastroenterology, Department  
of Medicine

10/2014 Vortrag bei den 18. Chirurgischen Forschungstagen  
„Kolorektales Karzinom und peritoneale  
Metastasierung - Strukturelle und funktionelle  
Änderungen im Tumormilieu“, Hannover

## Promotion

---

2012-2016  
am Lehrstuhl für Chirurgie der Universität Regensburg  
zum Thema „Peritoneale Metastasierung des kolorektalen Karzinoms führt zu funktionellen Änderungen des Tumormilieus und beeinflusst die Tumorzellproliferation“ betreut durch Prof. Dr. Schlitt und Prof. Dr. Fichtner-Feigl

## Publikationen

---

Seebauer CT, Brunner S, Glockzin G, Piso P, Ruemmele P, Schlitt HJ, Geissler EK, Kesselring R, Fichtner-Feigl S, “Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer is characterized by structural and functional reorganization of the tumor microenvironment inducing senescence and proliferation arrest in cancer cells”, Oncolmmunology, Dezember 2016

Kesselring R, Glaesner J, Hiergeist A, Naschberger E, Neumann H, Brunner S, Wege AK, Seebauer CT, Köhl G, Merkl S, Croner RS, Hackl C, Stürzl M, Neurath MF, Gessner A, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S, “IRAK-M Expression in Tumor Cells Supports Colorectal Cancer Progression through Reduction of Antimicrobial Defense and Stabilization of STAT3”, Cancer Cell, 29(5):684-696, Mai 2016

Hartmann P, Seebauer CT, Mazagova M, Horvath A, Wang L, Llorente C, et al., “Deficiency of intestinal mucin-2 protects mice from diet-induced fatty liver disease and obesity”, American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, ajpgi 00094 2015, Dezember 2015

Hartmann P, Seebauer CT, Schnabl B, “Alcoholic liver disease: the gut microbiome and liver cross talk”, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 39(5):763-75, Mai 2015

## Förderung

---

11/2014 - 05/2015  
Forschungsstipendium und Austauschprogramm „Independent Research Project“ der Universität Regensburg mit der University of California San Diego

## Tätigkeiten neben dem Studium

---

2013 - 2014  
Einführung in die Ultraschalldiagnostik in der Chirurgie (Praktische Übungen)  
Klinik für Chirurgie, Prof. Dr. Schlitt  
Universitätsklinikum Regensburg

2013 - 2014  
Fortbildung „Gute wissenschaftliche Praxis“

2010 - 2012  
Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie  
Prof. Dr. med. Witzgall, Universität Regensburg

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe. Ferner bin ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen. Ich habe meine medizinische Hochschulprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden.

Zusätzlich sind mir keine Tatsachen bekannt, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen.

Außerdem erkläre ich hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Juli 2017